

ISOLIERUNG
UND CHARAKTERISIERUNG
DES CYTOCHROM C₁-GENS DER HEFE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Ingrid Sadler



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG

DES CYTOCHROM C₁-GENS

DER HEFE

SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Dissertation der

Fakultät für Biologie

durchgeführt am Institut für

Genetik und Mikrobiologie

der LMU München

vorgelegt von

Ingrid Sadler

München im Mai 1986

1. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Kaudewitz

2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.1986

Aus aktuellen Gründen wurden Teile dieser Arbeit bereits
veröffentlicht:

Sadler, I.; Suda, K.; Schatz, G.; Kaudewitz, F. and Haid, A.

Sequencing of the nuclear gene for the yeast cytochrome c_1
precursor reveals an unusually complex amino-terminal presequence

EMBO J.3, 2137-2143, 1984

Für meine Eltern

Alles sieht aus wie echt verstanden,
ergriffen und gesprochen und ist es
im Grunde doch nicht, oder es sieht
nicht so aus und ist es im Grunde doch.

Heidegger, Sein und Zeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung S.1 - 9
2. Material S.10 - 14
3. Methoden S.15 - 24
4. Ergebnisse S.25 - 82
 - 4.1 Einleitung S.25
 - 4.1.1 Konstruktion transformier- und selektierbarer Mutanten S.25
 - 4.2 Analyse des Mutantenphänotyps S.26 - 28
 - 4.3 Transformation der Mutante 2006/2 mit einer genomischen Hefegenbank S.28 - 31
 - 4.3.1 Mitotische Segregation S.31 - 32
 - 4.3.2 Plasmid-DNA-Isolierung aus Hefetransformanten und Rück - transformation S.33 - 36
 - 4.3.3 In vitro Translation mit hybrid-selektierter RNA S.37 - 38
 - 4.3.4 Expression des plasmidgebundenen Cytochrom c1-Gens in Hefe S.39
 - 4.4 Charakterisierung des Plasmids YEp13-41 und Subklonierung S.39 - 42
 - 4.5 DNA-Sequenzierung S.42
 - 4.5.1 "Shotgun"-Klonierung in mp8 S.42 - 44
 - 4.5.2 Sequenzierung nach Sanger S.44 - 51
 - 4.5.3 Ausdehnung der Sequenzarbeiten im 5'-Bereich S.52 - 60
 - 4.5.4 Sequenzanalyse S.61
 - 4.6 Bestimmung der Zahl der Genkopien im Hefegenom S.61 - 64
 - 4.7 Analyse des Cytochrom c1-Transkripts S.65
 - 4.7.1 Größenbestimmung S.65
 - 4.7.2 Endenbestimmung durch S1-Kartierung S.65 - 68

- 4.9 Expression des plasmidgebundenen Cytochrom c1-Gens in Hefe
S.69 - 79
- 4.9 Genkartierung S.80 - 82
- 5. Diskussion S.83 - 100
- 6. Literatur S.101 - 107
- 7. Zusammenfassung S.108 - 109
- 8. Danksagung S.110
- 9. Lebenslauf S.111

1. Einleitung

Die Biogenese der Mitochondrien und ihrer individuellen Komponenten ist in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung geworden. Ein großer Teil dieser Untersuchungen wird an niederen Eukaryonten, besonders an Hefe durchgeführt. Hefe bietet sich gerade für die Mitochondrienforschung als ideales Objekt an, da sie die zum Wachstum nötige Energie nicht nur aus der mitochondrialen Atmung und oxidativen Phosphorylierung, sondern auch durch alkoholische Gärung gewinnen kann. Es ist dadurch möglich, die Einflüsse mitochondrialer oder karyotischer Mutationen auf die Mitochondrien selbst zu analysieren, ohne daß der Ausfall mitochondrialer Produkte - wie in anderen eukaryotischen Organismen - letal wäre.

Darüber hinaus ist Hefe als wichtiges molekularbiologisches Experimentiersystem immer mehr in den Vordergrund gerückt, da zum einen die klassische Genetik sehr gut entwickelt ist und zum anderen eine Vielzahl neuer gentechnologischer Methoden zur Verfügung stehen.

Funktionsfähige Mitochondrien entstehen durch die präzise, aufeinander abgestimmte Zusammenarbeit zweier unabhängiger genetischer Systeme. Obwohl die Mitochondrien ein eigenes Genom besitzen und selbst Proteinsynthese betreiben, wird der größte Teil der mitochondrialen Proteine im Kern kodiert, im Cytoplasma synthetisiert und dann in die Mitochondrien transportiert (Schweyen and Kaudewitz, 1970; Schatz and Mason, 1974; Neupert and Schatz, 1981).

Die enge Verzahnung der genetischen Systeme des Kerns und der Mitochondrien wird besonders deutlich am Beispiel der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe. Ein intensiv untersuchter Komplex bei verschiedenen Organismen ist der Komplex III (Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase) der mitochondrialen Atmungskette. Dieser Komplex entsteht bei Hefe aus dem koordinierten Zusammenbau eines mitochondrial synthetisierten Polypeptids (Cytochrom b) mit acht bis neun importierten Untereinheiten (Katan et al., 1976; Siedow et al., 1978; Marres, 1983). Drei seiner Untereinheiten (Cytochrom b = SU III, Cytochrom c_1 = SU IV und ein FeS-Protein = SU V) tragen Redoxgruppen und sind am Elektronentransport durch den Komplex direkt beteiligt; die genaue Funktionsbestimmung der übrigen Untereinheiten steht

bisher noch aus.

Thema der vorliegenden Doktorarbeit ist die Isolierung und Charakterisierung des Strukturgens des Cytochroms c_1 .

Dieses Polypeptid ist neben Cytochrom b, Cytochrom c_1 und Cytochrom aa3 eines der vier spektroskopisch nachweisbaren Cytochrome der Atmungskette und besitzt ein kovalent gebundenes Häm-molekül (Ross and Schatz, 1976). Im Komplex III ist es zum Intermembranraum hin orientiert und laut Wakabayashi et al. (1980) wohl nur über eine 15 Aminosäuren lange hydrophobe Sequenz am C-Terminus in der inneren Membran verankert. Seine Funktion ist die Übertragung von Elektronen vom FeS-Protein auf Cytochrom c, ein lösliches Protein des Intermembranraums (Shimomura et al., 1985).

Zwei Aspekte der mitochondrialen Biogenese, die relevant für die Analyse des Cytochrom c_1 -Gens sind, sollen kurz dargestellt werden. Dies sind zum einen der Prozeß des Imports von Proteinen in Mitochondrien und zum anderen die Regulation der Genexpression kernkodierter mitochondrialer Proteine.

1. Import

Alle Proteine der Mitochondrien, die im Kern kodiert sind, werden an freien cytoplasmatischen oder an mitochondrial gebundenen Ribosomen translatiert (Suissa and Schatz, 1982) und posttranslational ins Mitochondrium importiert (rev. in Hay et al., 1984; Harmey and Neupert, 1985). Die Importvorgänge unterscheiden sich, je nachdem für welches mitochondriale Kompartiment (OM = Äußere Membran, IM = Innere Membran, IMS = Intermembranraum, M = Matrix) das Protein bestimmt ist.

Proteine, die in eines der inneren Kompartimente (IMS, IM, M) transportiert werden, werden grundsätzlich als längere Präkursoren mit einer N-terminalen Präsequenz (Signalpeptid) synthetisiert und nach dem Import, für den eine energetisierte innere Membran erforderlich ist (Gasser et al., 1982; Schleyer et al., 1982), von einer Metalloprotease im Matrixraum zur reifen Form prozessiert (Boehni et al., 1980; McCada and Douglas, 1982). Die Präsequenz enthält vermutlich alle notwendigen Informationen für das Erkennen der Mitochondrien und die korrekte intramitochondriale Lokalisierung. Sie ist für den Import des Proteins unabdingbar, da von Gasser et al. (1982) und Riezman et al. (1983) gezeigt wurde, daß erstens reife Proteine

Präkursorproteine beim Import nicht kompetitiv verdrängen können und zweitens, daß Präkursorproteine, denen die Präsequenz in vitro von der Matrixprotease abgespalten wurde, nicht mehr in die Mitochondrien transportiert werden können.

Die beiden Formen des Cytochroms c (Iso-1-Cytochrom c und Iso-2-Cytochrom c) bilden eine Ausnahme unter den Proteinen der inneren Kompartimente, da sie, obwohl Transport in den IMS erfolgt, weder eine Präsequenz besitzen, noch Energie dafür benötigt wird (Korb and Neupert, 1978; Zimmermann et al., 1979). Im Gegensatz zu den Proteinen der inneren Kompartimente, aber ähnlich zu Cytochrom c, besitzen die Komponenten der äußeren Membran keine Präsequenz und brauchen für ihre Integration keine energetisierte Membran. Die Information zur Erkennung der Mitochondrien beziehungsweise für den Einbau in die OM sitzt - soweit bekannt - am N-Terminus der Proteine. Sie wird aber im Gegensatz zu den Proteinen der anderen drei Kompartimente nicht abgespalten (Freitag et al., 1982; Mihara et al., 1982; Hase et al., 1983; Mihara and Sato, 1985).

Cytochrom c₁ weist hinsichtlich seines Imports einige Besonderheiten auf. Es wird wie noch einige andere Hämproteine des IMS (Cytochrom b₂ und Cytochrom c Peroxidase = CCPO) in zwei Schritten prozessiert (Ohashi et al., 1982). Der Präkursor (P=37 kDa) wird zuerst durch die bereits erwähnte Matrixprotease zu einer intermediären Form (I=35 kDa) geschnitten; der zweite Schnitt, der die reife Form liefert (M=31 kDa), erfolgt durch eine zweite, bis jetzt noch nicht identifizierte Protease in der inneren Membran. Beim Cytochrom c₁ wird im Gegensatz zu Cytochrom b₂ und CCPO für den zweiten Prozessierungsschnitt zusätzlich Häm benötigt, das an die intermediäre Form angelagert wird (Schwieters, 1981); in hämdefekten Mutanten wird dieser Schritt blockiert; dadurch reichert sich die hämfreie I-Form an (Gasser et al., 1982). Für Cytochrom c₁ ergibt sich also folgen - des Modell der Prozessierung:

$P \longrightarrow I \longrightarrow I\text{-Häm} \longrightarrow M.$

2.Regulation

Bestimmte physiologische Bedingungen, wie Glukoserepression, Anaerobiosis oder Hämdefizienz, führen zum Ausfall der mitochondrialen Atmung und zwingen die Hefezelle, ihren Energiebedarf durch die alkoholische Gärung zu decken. Soweit bisher

untersucht, führen alle drei Stoffwechselbedingungen - in unterschiedlichem Ausmaß - zu einer reduzierten Biosynthese von Proteinkomponenten der Atmungskette bzw. der oxidativen Phosphorylierung. Auf welcher Stufe der Genexpression (Transkription, Translation, Import bzw. Prozessierung, Assemblierung) die Regulatoren Sauerstoff, Häm und Glukose wirksam werden, ist bis jetzt erst in wenigen Fällen geklärt.

a) Häm

Von Saltzgeber-Müller und Schatz (1978) wurde die Rolle von Häm auf die Bildung funktionsfähiger Cytochrom-c-Oxidase, ein Atmungskettenkomplex der inneren Membran (Komplex IV) - untersucht. Die Cytochrom-c-Oxidase besteht aus 7 Untereinheiten, von denen drei mitochondrial- und vier kernkodiert sind. Die Autoren finden, daß in Abwesenheit von Häm keine Assemblierung des Komplexes mehr stattfindet. Außerdem sind einige der Untereinheiten gar nicht (V, VII) oder kaum mehr (I, IV) nachweisbar. Als Erklärungsmöglichkeit diskutieren die Autoren, daß entweder ohne Häm der Komplex nicht zusammenfindet und deshalb einige der Untereinheiten degradiert werden oder daß Häm direkt in die Transkription oder Translation der Untereinheiten eingreift. Die Biosynthese der Apoform von Häm-Proteinen wie Katalase A und T (nicht mitochondrial) (Woloszczuk et al., 1980) oder Iso-1-Cytochrom c (Matner and Sherman, 1982) ist in Häm-defizienten Zellen drastisch reduziert. Richter et al. (1980) und Sledziewski et al., (1981) konnten im Fall der Katalase T zeigen, daß sowohl eine Regulation der Transkription als auch eine Regulation auf post-transkriptionalem Niveau dafür verantwortlich ist. Im Falle von Iso-1-Cytochrom c erbrachten Guarente et al. (1983, 1984) den Nachweis einer hämabhängigen Transkriptionskontrolle (siehe unter d).

Bei Cytochrom c₁ konnten wie bereits erwähnt Ohashi et al., (1982) zeigen, daß in hämdefizienten Mutanten das Polypeptid nicht zur reifen Form prozessiert werden kann und als Häm-freies Intermediat in den Mitochondrien vorliegt. Es läßt sich bisher aber nicht ausschließen, daß weitere Formen der Hämkontrolle (Transkriptions- oder Translationsniveau) vorliegen, die der möglichen Feinregulation dienen.

b) Sauerstoff

Wachstum von Hefezellen unter Sauerstoffausschluß führt zum Verschwinden normaler Mitochondrien und zur Akkumulation atemungsdefekter Promitochondrien. Diese weisen im elektronenmikroskopischen Bild keine starke Faltung der Innenmembran mehr auf und sind gekennzeichnet durch das vollständige Fehlen der charakteristischen Absorptionsspektren der Atmungsketten-Cytochrome a, a₃, b, c, c₁ (Criddle and Schatz, 1969).

Versuche zum immunologischen Nachweis der Apoformen von Cytochrom c₁ und Iso-1-Cytochrom c ergaben als Befund, daß im ersteren Fall kein immunpräzipitierbares Produkt mehr nachweisbar ist (Ross and Schatz, 1976); im zweiten Fall ist die Synthese drastisch reduziert.

Die Synthese individueller Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase fällt nach anaerobem Wachstum um das 10-100 fache ab (Woodrow and Schatz, 1979). Darüberhinaus verhindert das Fehlen von Sauerstoff spezifisch die Assemblierung der mitochondrialen Untereinheiten I und II mit den kernkodierten Faktoren VI und VII.

Einschränkend muß gesagt werden, daß es schwierig ist, Häm und Sauerstoff als unabhängige Variable handzuhaben, da es bei anaerobem Wachstum zum Ausfall der Hämsynthese kommt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Enzyme Coproporphyrinogen- und Protoporphyrinogen-Oxidase im Hämbiosyntheseweg Sauerstoff als Substrat benötigen (Mattoon et al., 1979; Labbe-Bois et al., 1983).

c) Katabolitrepression

Die Synthese sowohl der Membran als auch der Matrixkomponenten der Mitochondrien ist der Katabolitrepression ausgesetzt. In Hefezellen, die in Gegenwart eines schnell fermentierbaren Substrats wie z.B. Glukose gezogen sind, nimmt die Menge an mitochondrialen Protein im Vergleich zur Proteinmenge aus Zellen, die in nicht-fermentierbaren Substraten wie Glyzerin- oder Ethanolmedium gezogen wurden, um mehr als die Hälfte ab. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß Mitochondrien aus reprimierten Zellen eine nur schwach entwickelte Innenmembran ausbilden und auch ihre Zahl in den Zellen reduziert ist. Der Prozeß der Katabolitrepression scheint kernkodiert und -kontrolliert zu sein, da ϕ^0 Zellen, d.h. Zellen ohne mito -

chondriale DNA, noch der Repression unterliegen (Tzagoloff, 1975).

Am Beispiel der kernkodierte Untereinheiten I, II, VII und VIII des Komplexes III konnten v. Loon und Mitarbeiter (1982, 1984) zeigen, daß die Menge an translatierbarer RNA aus reprimierten Zellen unter 5% der RNA-Menge sinkt, die unter dereprimierten Bedingungen (2.5% Laktat) gebildet wird. Weitere überzeugende Hinweise auf eine Transkriptionskontrolle bei der Katabolit-repression sind im Falle von Iso-1-Cytochrom c bekannt. In reprimierten Zellen ist die Menge an Apoprotein in ungefähr dem gleichen Ausmaß reduziert wie die Menge an RNA (Zitomer and Hall, 1976; Zitomer and Nichols, 1978; Zitomer et al., 1979).

d) Klärung der molekularen Vorgänge bei der Regulation durch physiologische Signale

Bei mehreren Hefegenen, die ebenfalls über physiologische Signale reguliert werden, wurden kurze DNA-Sequenzen gefunden, die 5'-seitig oberhalb des jeweiligen Transkriptionsstarts liegen und für die positive oder negative Kontrolle dieser Gene verantwortlich sind (rev. bei Guarente, 1984). Die Transkription der Gene Gal1, 7, 10 z.B. wird durch Galaktose im Medium bis zu 1000-fach induziert (St. John and Davis, 1981). Bei den Genen Gal1 und Gal10 konnte nachgewiesen werden, daß das Gal4-Genprodukt mit Sequenzen, die oberhalb des Transkriptionsstarts liegen, in Wechselwirkung tritt und dadurch positiv regulierend wirkt (Giniger et al., 1985).

Die allgemeine Aminosäurekontrolle bei Hefe wird auf ähnliche Art und Weise reguliert. Wird die Zelle für eine bestimmte Aminosäure ausgehungert, werden die entsprechenden Enzyme der Aminosäurebiosynthese aktiviert, indem ein positives Regulatorprotein mit "upstream activation sites" (UAS) in Verbindung tritt und damit die Transkription induziert (Hope and Struhl, 1985).

Dieser Wirkungsmechanismus, daß also unter bestimmten physiologischen Bedingungen ein trans-wirkender Aktivator mit cis-wirkenden Kontrollsequenzen reagiert und damit

Transkriptions-aktivierend wirkt, scheint auch bei der Kontrolle der Genexpression mitochondrialer Enzyme zu funktionieren.

Guarente und Mason (1983); Guarente et al. (1984) und Gudenus et al. (1984) fanden beim CYC1-Gen (kodiert für Iso-1-cytochrom c, nicht für Cytochrom c₁) zwei solcher cis-wirksamer UAS-

Sequenzen, indem sie Deletions- und Sequenzanalysen durchführten. Bei Deletionen im 5'-Bereich des Gens traten Wirkungen auf, welche die Expression des Gens störten. Sie fanden zwei Bereiche, die für die optimale Expression notwendig sind, zum einen - wie erwartet - die Stelle der Transkriptionsinitiation, zum anderen eine Region bei ca. -275 (bezogen auf den Transkriptionsstart), bei deren Fehlen die RNA-Menge stark reduziert wurde. Nach genauerer Analyse zeigte sich, daß sich dieser zweite Bereich aus zwei "Unter"sequenzen zusammensetzt: UAS1 (-275 bezogen auf den Transkriptionsstart) und UAS2 (-225).

Beide Sequenzen zeigen - ähnlich wie die UASs anderer Gene - Eigenschaften, die an die Enhancerstrukturen eukaryotischer Gene erinnern (Khoury and Gruss, 1983): der Abstand zwischen Transkriptionsstart und UAS ist in gewissen Grenzen flexibel, und sie sind auch dann noch funktionell, wenn sie in Bezug auf den Transkriptionsstart in anderer Orientierung vorliegen (Guarente and Hoar, 1984). Worin sich UAS1 und UAS2 des CYC1-Gens jedoch deutlich von Enhancersequenzen unterscheiden ist die Tatsache, daß sie nicht mehr 3'-seitig des Transkriptionsstarts funktionieren; es gibt also einen (bisher noch nicht bekannten) Unterschied in der Wirkungsweise von Hefe-UAS-Sequenzen und Enhancersequenzen bei höheren eukaryotischen Zellen.

Die beiden UAS-Sequenzen des CYC1-Gens haben eine homologe Sequenz, scheinen aber unabhängig voneinander wirksam zu sein: In Glukosemedium und bei Vorhandensein von Häm wird praktisch die ganze CYC1-Transkription von UAS1 reguliert, in dereprimierendem Laktatmedium (+Häm) von UAS1 und UAS2 zusammen in ungefähr den gleichem Ausmaß, d.h. die UASs vermitteln die Katabolit - repression. Unter anaeroben oder hämdefizienten Bedingungen sind beide UASs inaktiv und die Expression wird ca. 200 fach reduziert.

Um Genprodukte isolieren zu können, die als positive Aktivatoren wirken, wurden trans-wirkende Mutationen untersucht. Guarente et al. (1984) fanden drei Mutationen, die zwischen den beiden UAS-Sequenzen diskriminieren (hap1, hap2 und hap3; hap = heme activator protein): In hap1-Mutanten ist die Interaktion zu der UAS1-Sequenz gestört, d.h. es findet keine Induktion durch Häm mehr statt und auch keine Derepression in veratembarem Laktat - medium. Hämkontrolle und Katabolitrepression werden also wahr - scheinlich über den gleichen Mechanismus durchgeführt. Die

Autoren vermuten, daß die Hämkontrolle dadurch zustande kommt, daß Häm mit einem Hap1-Genprodukt einen Komplex bildet und dieser dann durch Bindung an die UAS1 die Transkription aktiviert. Alternativ könnte Häm aber auch unmittelbar auf die Synthese des Hap1-Genproduktes einwirken.

Auf den Prozeß der über UAS2 gesteuerten Transkription hat die hap1-Mutation keinen Einfluß. Zwei weitere, hap1 komplementierende Mutationen, hap2 und hap3 hingegen reduzieren die Aktivität von UAS2 stark.

Pinkham und Guarente (1985) haben festgestellt, daß die hap2- und hap3-Mutationen pleiotrop wirken und sowohl die Menge von Iso-2-Cytochrom c reduzieren als auch ein Wachstum auf nicht-fermentierbaren Medien verhindern. Die Autoren vermuten, daß die Hap2- und Hap3-Genprodukte einen Komplex bilden, der an die UAS2 des CYC1-Gens und möglicherweise auch an die anderer ähnlich regulierter Gene bindet und damit die Transkription aktiviert.

Eine Untersuchung des Cytochrom c₁-Gens ist aus den oben geschilderten Gründen sehr aktuell¹. Seine Isolierung sowie die Bestimmung der Nukleotidsequenz eröffnen zum einen die Möglichkeit, die Regulation des Polypeptids auf Transkriptionsniveau zu studieren und zu klären, ob diese ähnlich komplex ist, wie im Falle von Iso-1-Cytochrom c. Zum anderen wird erhofft, durch die abgeleitete Aminosäuresequenz Informationen über die Struktur von topologischen Signalsequenzen (Blobel, 1980) zu erhalten, die für das Erkennen der Mitochondrien, für die richtige intramitochondriale Lokalisierung sowie die korrekte Assemblierung von Bedeutung sind.

Vorarbeiten zu diesem Projekt wurden am Institut von Schwieters (1981) und Lang und Kaudewitz (1982) geleistet.

Nach Mutationsinduktion wurden karyotische, atmungsdefekte Zellen (ρ^{-}) isoliert und jene ausgewählt, die im Tieftemperaturspektrum einen spezifischen Ausfall der spektralen Bande des Cytochroms c₁ bei 554 nm aufwiesen. Diese Mutanten wurden genetisch und biochemisch weiter untersucht. Sie ließen sich zwei Komplementationsgruppen zuordnen, die sich phänotypisch unterscheiden. Mutanten der Komplementationsgruppe I akkumulieren I-Form ohne Häm, Mutanten der Komplementationsgruppe II häufen I-Form mit Häm an. In der Komplementationsgruppe II gibt es außerdem Mutanten, bei denen kein immunpräzipitierbares Cytochrom

c₁ mehr nachzuweisen ist.

Eine Kreuzung mit Wildtyp (wt) ergibt für Mutanten der Komplementationsgruppe I Diploide, die keine I-Form sondern nur noch reife Form produzieren, während diese Kreuzung bei den Mutanten der Komplementationsgruppe II Diploide ergibt, die sowohl I-Form als auch M-Form akkumulieren.

Aus diesem Befund von Schwieters (1981) wurde abgeleitet, daß Mutanten der Komplementationsgruppe II vermutlich einen Defekt im Strukturgen tragen. Mutanten der Komplementationsgruppe II ohne immunologisch nachweisbares Cytochrom c₁ könnten entweder im Promoterbereich defekt sein oder eine nonsense-Mutation im N-terminalen Bereich (Präsequenz) haben, gegen den kein Antiserum verfügbar war. Mutanten der gleichen Gruppe mit angereicherter, hämtragender I-Form könnten im Prozessierungsschritt von I nach M defekt sein, z.B. weil sie eine Mutation in einer Signalsequenz für die zweite Protease haben und dadurch den zweiten Prozessierungsschritt blockieren.

Mutanten dieser Komplementationsgruppe II wurden deshalb zu Beginn der Arbeit ausgewählt, um mit den Methoden der genetischen Komplementation nach Transformation mit einer Hefe-Genbank das Cytochrom c₁-Strukturgen zu isolieren und zu charakterisieren.

2. Material

2.1 Abkürzungen

A	Adenosin
amp	Ampicillin
ars	autonomous replicating sequence
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CCPO	Cytochrom c Peroxidase
(k)Da	(kilo) Dalton
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleotid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EtOH	Ethanol
G	Guanosin
Gly	Glyzerin
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilo - Basenpaar
(m)M	(milli)Molar
min	Minute
O.D.	Optische Dichte
OFAGE	orthogonal field alternation gel electrophoresis
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
pet	petit (Mutanten)
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RF	replikative Form=doppelsträngige Form der M13-DNA
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SOD	Superoxid-Dismutase
SDS	Natriumlaurylsulfat
ss	einzelsträngig
T	Thymin
tet	Tetrazyklin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtkultur
V	Volt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

2.2 Feinchemikalien

Alle Chemikalien waren vom höchsten Reinheitsgrad und wurden, falls nicht anders vermerkt von der Firma Merck, Darmstadt bzw.

von der Firma Baker, Groß Gerau bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, St. Louis, USA
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll	Sigma, St. Louis, USA
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Glucose	Hedinger, Stuttgart
Harnstoff	Fluka, Buchs, Schweiz
Helicase	Boehringer, Mannheim
IPTG	Sigma, St. Louis, USA
Lysozym	Sigma, St. Louis, USA
Nukleotide	Boehringer, Mannheim
Medien zur Anzucht	Difco, Detroit, USA
PEG	BDH, Poole, UK
Primer ,15mer	Boehringer, Mannheim
X-Gal	Boehringer, Mannheim
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zymolyase	Seikagaku, Kogyo, Japan

2.3 Radiochemikalien und Enzyme

Die Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler, Braunschweig und New England Nuclear, Dreieich bezogen; die Restriktionsenzyme und die DNA-modifizierenden Enzyme von Boehringer, Mannheim und Renner, Dannstadt.

2.4 Medien

Hefe:	YPD	1 % Yeast Extrakt 2 % Pepton 2 % Glucose (2 % Agar für Festmedien)
	YEPG	1 % Yeast Extrakt 2 % Pepton 3 % Glyzerin 1 % Ethanol (2 % Agar für Festmedien)
	YPGal	1 % Yeast Extrakt 2 % Pepton 2 % Galaktose (2 % Agar für Festmedien)
	WO	0.67 % Yeast Nitrogen Base 2 % Glucose

(2 % Agar für Festmedien)
Aminosäuren, Purine und Pyrimidine nach Bedarf

Präsporulationsmedium
0.8 % Yeast Extrakt
0.3 % Pepton
10 % Glucose
2 % Agar

Sporulationsmedium
0.1 % Yeast Extrakt
0.05 % Glucose
1 % Kaliumazetat
2 % Agar

Bakterien: LB 1 % Trypton
0.5 % Yeast Extrakt
0.5 % NaCl
(1.5 % Agar für Festmedien)
nach Bedarf 50 g/ml amp
10 g/ml tet

M9 6 g Na_2HPO_4
3 g KH_2PO_4
0.5 g NaCl
1 g NH_4Cl
1 ml MgSO_4 1M
0.1 ml CaCl_2 1M
1 ml Thiamin (10 mg/ml)
(1.5% Agar für Festmedien)
Aminosäuren und Kohlenstoff - Quellen nach
Bedarf

2.5 Stämme

2.5.1 Hefestämme

AH22 a, leu2-3, leu2-112, his4-519, can^R
(Hinnen et al., 1978)

AH33 α , leu2-3, leu2-112, his4-519, can^R (Hinnen)

DBY746 α , his3- 1, leu2-3, leu2-112, ura3-52, trp1-289
(Falco et al., 1982)

DBY747 a, his3- 1, leu2-3, leu2-112, ura3-52, trp1-289
(Botstein et al., 1979)

D273/10B α , prototroph (Sherman et al., 1968)

FL100 a, ura3-251, ura3-372, ura3-328

(Fasiolo et al., 1981)

SM11/6c	a, ura ⁻ , met ⁻ (Schweyen et al., 1976)	
S150	a, leu2-3, leu2-112, his3, trp1-289, ura3-52 (CSH)	
AH215	a, leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15, can ^R (Hinnen)	
VB220A	α, ade2 ⁻ , leu2 ⁻ , ura3 ⁻ , trp1 ⁻	
DC04	α (Carle and Olson, 1985)	
2006/2	a, leu2 ⁻ , his3 ⁻ , ura1 ⁻ , pet ⁻	
1165/11	a, leu2 ⁻ , his3 ⁻ , ilv ⁻ , pet ⁻	
1165/101	α, ura ⁻ , pet ⁻ , weitere Auxotrophien nicht geprüft	
1165/102	α, leu2 ⁻ , his3 ⁻ , trp ⁻ , pet ⁻	
005/1	α, leu2 ⁻ , ura ⁻ , his3 ⁻ , pet ⁻	
2024/2	a, leu ⁻ , his ⁻ , pet ⁻	
3101/2	a, leu ⁻ , pet ⁻ , weitere Auxotrophien nicht geprüft	
0526/2a	α, leu ⁻ , pet ⁻	"
1302/4c	α, leu ⁻ , pet ⁻	"

2.5.2 Bakterienstämme

SF8	lop11, lig, supE, recB ⁻ , C ⁻ , hsdS, leu ⁻ , thr ⁻ (Hohn und Hinnen)	
JM101	ΔlacproAB, supE, thi ⁻ (F' proAB, traD36, lacI ^q , ZΔM15) (Kedes et al., 1975)	
HB101	pro ⁻ , leu ⁻ , thi ⁻ , lacY ⁻ , hsdR ⁻ , endA ⁻ , recA ⁻ , rpsL20, ara-14, galK2, xyl-5, mt1-1, supE44 (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969; Bolivar and Backman; 1979)	

2.6 Plasmide

YEp13 (Broach et al., 1979): 10.7 kb; Hefereplikon 2μ ;
genetische Marker: Hefe - LEU2, E.coli - amp, tet, leuB

YIp5 (Struhl et al., 1979): 5.4 kb; kein Hefereplikon;
genetische Marker: Hefe - URA3, E.coli - amp, tet

YEp24 (Chevallier et al., 1980): 7.7 kb; Hefereplikon 2μ ;
genetische Marker: Hefe - URA3, E.coli - amp, tet

pCEN11 (Oertl et al., 1984): 7.4 kb; Hefereplikon ars;
genetische Marker: Hefe - TRP1, E.coli - amp,

3. Methoden

3.1 Konstruktion transformierbarer Mutantenstämme durch Canavanin-Selektion

Eine WO-Platte wird mit Aminosäuren so supplementiert, daß die haploiden Stämme nicht wachsen können, sondern nur die nach Kreuzung entstandenen Diploiden. Auf dieser Platte wird je ein Tropfen der beiden Ausgangsstämme, von denen einer Can^R ist, miteinander vermischt, ein Tropfen 10% Hefeextrakt dazugegeben und das Ganze zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die Diploiden werden zu Einzelkolonien ausgestrichen. Von diesen werden mehrere abisoliert und zuerst auf Präsporulationsplatten (30°C , über Nacht), dann auf Sporulationsplatten (gegebenenfalls supplementiert) (RT=Raumtemperatur) bebrütet. Wenn im Mikroskop Tetraden zu erkennen sind, werden Zellen abgenommen und in $500\ \mu\text{l}$ H_2O suspendiert. Die Tetradenhülle wird mit Helicase angedaut ($2\ \mu\text{l}$ Helicase, 2h bei 37°C), dann wird die Zellsuspension mit 5 ml H_2O verdünnt und mit Ultraschall ($6 \times 10\text{sec}$) behandelt.² Die Sporen werden auf Canavanin-Platten ausplattiert, inkubiert und anschließend auf Selektivplatten gestempelt. Aus den Einzelkolonien wird dann der gesuchte pet^- -Phänotyp isoliert.

Bei der Canavanin-Selektion macht man sich zunutze, daß diese Antibiotika-Resistenz rezessiv ist. Daraus folgt, daß die Diploiden immer sensitiv sind, man also nach der Sporulation bei der Abisolierung Canavanin-resistenter Kolonien immer nur Haploide und keine Diploiden mit gleichen Auxotrophien isoliert.

3.1.1 φ° Test

Um zu testen, ob eine rezessive karyotische Mutante (pet^-) nicht gleichzeitig auch defekt im mitochondrialen Genom ist (φ° , φ^- , mit^-), werden die Ausgangsmutanten mit einem φ° Testerstamm gekreuzt. Nach der Diploidisierung können Mutanten nur dann auf nicht vergärbaren Medien wie Glyzerin wachsen, wenn sie φ^+ sind. Die pet^- Mutante wird vom PET^+ des Testerstammes komplementiert; falls die Mutante zusätzlich noch φ° oder φ^- ist, ist ein Wachstum der Diploiden auf diesen Medien nicht möglich.

3.2 Transformation

3.2.1 Hefetransformation

Die Hefetransformation wurde im wesentlichen nach dem Protokoll von Hinnen (1978) durchgeführt. Die Isolierung von Transformanten nach der "Zwei-Stufen-Selektion" und ihre weitere Untersuchung (mitotische oder meiotische Segregation der Plasmide) wurde von O'Malley et al. (1982) beschrieben.

3.2.2 Bakterientransformation

Die Bakterientransformation wurde nach der Vorschrift von Mandel und Higa (1970) durchgeführt.

3.3 DNA Isolierung

3.3.1 Präparation von Hefe-DNA (Plasmid- und chromosomale DNA)

Wenn nur kleine DNA Mengen benötigt werden, kann nach der Methode von Winston et al. (1983) vorgegangen werden. Sie liefert ca 100 µg saubere, gut schneidbare DNA. Das Protokoll wurde nur in einem Punkt abgeändert: Die stationären Kulturen (40ml) werden vor der Präparation der DNA noch mit 1 ml 50% Glucose und 2 ml 10% Hefeextrakt versetzt und solange weiter geschüttelt bis die Zellen wieder Knospen bilden. Sie können dann auch mit Zymolyase 20 000 (nicht nur mit der im Protokoll angegebenen Zymolyase 60 000) aufgeschlossen werden.

3.3.2 Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNA

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien - transformanten wurde die Methode von Birnboim und Doly (1979) angewandt.

3.3.3 Plasmidpräparation im Großmaßstab (Birnboim and Doly, 1979)

Die Präparation großer Plasmid - DNA Mengen aus Bakterien nach der Methode von Birnboim und Doly wird in "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" von Maniatis et al. beschrieben.

3.4 Restriktionsverdau

Für einen analytischen Schnitt werden, je nach der Anzahl der erwarteten Banden, 0.5 - 2 µg DNA in einem Volumen von 10 - 20 µl eingesetzt.

Ein 20 μ l Ansatz enthält:

DNA in H₂O gelöst

2 μ l eines geeigneten 10 x Restriktionspuffers (L ow, M edium oder H igh - Salz, siehe unten)

1 - 2 U des Restriktionsenzym

ad 20 μ l mit H₂O (Quarzdest.)

Die Inkubation erfolgt bei der für das Restriktionsenzym angegebenen Temperatur für ca. 1 - 2h.

Für einen präparativen Schnitt werden ca. 50 - 100 μ g DNA eingesetzt, das Volumen des Ansatzes sollte dann mindestens 100 μ l betragen. Da präparative Schnitte meistens über Nacht inkubiert werden, genügt 1/5 bis 1/10 der Menge an Enzym/ μ g DNA im Vergleich zu analytischen Schnitten.

Die Reaktion wird je nach Bedarf auf unterschiedliche Weise gestoppt:

- a) 10 min erhitzen bei 65^oC (geht nicht bei allen Enzymen)
- b) Zugabe von EDTA, pH 7.5 zur Endkonzentration von 10mM
- c) Zugabe von Elektrophoresepuffer und sofortige Elektrophorese
- d) Phenolextraktion und Ethanolgefällung
- e) Einfrieren

Restriktionspuffer L , M , H nach Maniatis et al.,1983

Elektrophoresepuffer

10% Ficoll

0.05% Xylencyanol

0.025% Bromphenolblau

in 1x TE Puffer pH 8

TBE Puffer 1x

Tris HCl 45 mM

EDTA 0.5 mM

Borsäure 45 mM pH 8.3

3.5 Agarosegele

Es wurden bei der Agarose-Gelelektrophorese ausschließlich Horizontalgele benutzt, deren Herstellung, Trennbereich etc. ausführlich in dem Laborhandbuch "Molecular Cloning" von Maniatis et al. beschrieben wird.

3.6 Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

3.6.1 Elektroelution

Der Bereich des Gels, der die zu eluierende DNA-Bande enthält wird herausgeschnitten, zusammen mit ca. 400 µl 1xTBE Puffer in einen Dialyseschlauch überführt und in einer Elektrophoresewanne, die mit 1xTBE Puffer gefüllt ist, bei 100 V eluiert. Der Verlauf der Elution kann unter einer UV-Lampe verfolgt werden, da die DNA vorher mit EB (Ethidiumbromid) angefärbt worden ist. Nach Abschluß der Elution wird kurz (30 sec) umgepolt, die DNA mit einer Pasteurpipette aus dem Dialyseschlauch entfernt, über einen Swinex Filter (Millipore) gereinigt und mit 1/10 Vol 3M NaAc, pH 5.5 und 2.5 Vol EtOH gefällt (-20 °C, 1h).

3.6.2 "Biotrap"-Methode

Die "Biotrap" wird nach Angabe des Herstellers (Schleicher und Schüll) zusammengebaut, das Agarosestück mit der DNA in die Elutionskammer gelegt und mit 1xTBE Puffer überschichtet. Die "Biotrap" wird dann in eine mit 1xTBE Puffer gefüllte Elektrophoresewanne gestellt und die DNA mit 200 V in eine Membranfalle eluiert. Nach Beendigung der Elution, die auch hier mit der UV-Lampe überwacht werden kann, wird kurz umgepolt, die DNA aus der Membranfalle pipettiert und mit 1/10 Vol 4M NaClO₄ und 1 Vol Isopropanol bei RT gefällt.

3.7 Klonieren

Die für das Klonieren notwendigen Techniken wie Phosphatase -behandlung der DNA, Auffüllreaktionen an DNA-Fragmenten mit 5'- und 3'-Überstehenden Enden, Ligationen etc. sind in dem Laborhandbuch "Molekular Cloning" von Maniatis et al. ausführlich beschrieben und wurden nach den dort angegebenen Protokollen durchgeführt.

3.8 Phagenmethoden (M13)

3.8.1 Isolierung von RF-DNA

Zur Klonierung in M13 benötigt man die doppelsträngige DNA (RF Form = replikative Form). Die Vermehrung von M13-Phagen und die Präparation von RF-DNA wird von Messing beschrieben (Messing, 1983; Yanisch-Perron et al., 1985).

3.8.2 Herstellung von M13-Klonen für die Sequenzierung

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in M13-RF-DNA erfolgt nach den in 3.7 erwähnten Protokollen, die Transformation in den Stamm JM101 nach Messing, (1983).

3.8.3 Präparation von einzelsträngiger M13-DNA

Während man für die Klonierung doppelsträngige Phagen-DNA benötigt, braucht man für die Sequenzierung nach Sanger (1977, 1980) einzelsträngige DNA. Diese Einzelstrang-DNA liegt in den Phagen vor, die aus den Bakterien ausgeschleust werden (M13 ist kein lysierender Phage) und kann deshalb sehr einfach von den Bakterien abgetrennt werden.

Dazu werden 2 ml LB-Medium mit einem weißen Plaque und entweder 20 µl einer JM101 UK oder mit einer JM101 Einzelkolonie angeimpft und 8h-13h bei 37°C geschüttelt. 1.5ml der Kultur werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 min in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Vom Überstand wird ca. 1 ml abgenommen und mit 300 µl 20% PEG, 2.5M NaCl gemischt und 15 min bei RT stehen gelassen. Danach werden die Phagen 5 min in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um auch die letzten Reste des zähen PEG-Überstandes entfernen zu können, wird noch einmal kurz zentrifugiert und die Flüssigkeit mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Das Phagenpellet wird in 100 µl TE gelöst und mit 50 µl Phenol (gesättigt mit TE) phenolisiert. Die wässrige Phase wird sorgfältig abgenommen und mit 10 µl 3M NaAc pH 5.5 und 300 µl Ethanol bei -80°C für eine Stunde gefällt. Die DNA wird bei 4°C 10 min abzentrifugiert und das Pellet mit 80% EtOH gewaschen. Das getrocknete Pellet löst man in 50 µl TE pH 8.

TE - Puffer

Tris HCl	10 mM	pH 8
EDTA	0.1 mM	pH 8

3.9 DNA-Sequenzierung nach Sanger (1977, 1980)

3.9.1 Annealing

Der Annealing-Ansatz wird in eine 100 µl Glaskapillare einge -
schmolzen und in einem Wasserbad auf 100°C erhitzt. Sobald
das Wasser kocht, wird das Wasserbad abgeschaltet und die

Kapillaren durch Stehenlassen auf RT abgekühlt.

Annealing-Ansatz: 5 μ l ss DNA in TE (ca. 0.3 g)
 1 μ l Annealing Puffer
 1 μ l Pentadecamer Primer (Konz.
 2.5 μ g/ml)
 5.5 μ l H₂O Quarz dest.

Annealing-Puffer: Tris HCl 100 mM pH 8
 MgCl₂ 100 mM
 NaCl 500 mM

3.9.2 Sequenzreaktionen

Das Annealing - Gemisch wird aus der Kapillare in ein Eppendorf-Gefäß überführt und davon je 2 μ l in 4 deckellose Eppendorf-Gefäße verteilt und kurz abzentrifugiert. An den oberen Rand der Gefäße setzt man je 2 μ l der einzelnen Nukleotidgemische und daneben je 2 μ l der Polymeraselösung (pro Annealing-Reaktion: 1 - 1.5 U Klenow Polymerase, 4 μ Ci ATP ad 8 μ l mit 10mM Trislösung pH8). Durch kurzes Zentrifugieren wird die Reaktion gestartet und 15 min bei RT inkubiert. Danach pipettiert man in jedes Gefäß noch je 2 μ l Chase-Mix, zentrifugiert kurz und inkubiert wieder 15 min bei RT. Die Reaktion wird durch Hinzufügen von 4 μ l Elektrophoresepuffer gestoppt. Zur Denaturierung der DNA Kocht man die Gemische 3 min, stellt sie dann sofort auf Eis und trägt ca. 2 μ l von jeder Reaktion auf das Gel auf.

Nukleotidmischungen

a) ddNTP 0.8 mM ddTTP
 0.1 mM ddCTP
 0.2 mM ddGTP
 0.13 mM ddATP

gelöst in TE pH 7

b) dNTP-Gemische	T	C	G	A	
0.5 mM dTTP	10 ⁰	200 ⁰	200 ⁰	200 ⁰	$\left. \begin{array}{l} \mu\text{l} \\ \mu\text{l} \\ \mu\text{l} \end{array} \right\} \text{N}^{\circ}$
0.5 mM dCTP	200	10	200	200	
0.5 mM dGTP	200	200	10	200	

c) Sequenzierungsansatz

	N ⁰ (b)		ddNTP (a)
T	100	+	100 μ l
C	100	+	100 μ l
G	100	+	100 μ l
A	100	+	50 + 50 TE μ l

Chase

Je 20 μ l 20 mM dNTP + 720 μ l TE

Alle Lösungen werden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Elektrophoresepuffer

Xylencyanol	0.05 %
Bromphenolblau	0.05 %
Formamid, deionisiert	99 %
EDTA	10 mM
NaOH	10 mM

3.9.3 Sequenzgele

Es wurden Gele mit einem Puffergradienten gegossen und dafür folgende Acrylamidlösungen eingesetzt:

"Oberes" Gel:	10x TBE	25 ml
	Harnstoff	230 g
	Acrylamid 30% mit	100 ml
	0.8% Bisacrylamid	
	ad 500 ml mit H ₂ O Quarz dest.	
"Unteres" Gel:	10xTBE	25 ml
	Harnstoff	47 g
	Acrylamid 30% mit	20 ml
	0.8% Bisacrylamid	
	Sucrose	10 g
	ad 100 ml mit H ₂ O Quarz dest.	
10x TBE:	Tris HCl	162 g
	EDTA	9.5 g
	Borsäure	27.5 g
	ad 1 l mit H ₂ O dest.	

Für ein Gel, das aus 40 cm langen und 23 cm breiten Glasplatten, sowie 0.4 mm dicken Spacern zusammengebaut wird, benötigt man von der ersten Lösung ca. 50 ml, von der zweiten ca. 10 ml. Nach der

Flektrophorese, die bei 190 V - 200 V durchgeführt wird, wird das Gel in 10% Methanol, 10% Essigsäure fixiert, dann auf ein Whatman 3 MM-Papier transferiert und auf einem Geltrockner getrocknet. Es kann dann über Nacht bei RT ohne Verstärkerfolie exponiert werden.

3.10 DNA Sequenzierung nach Maxam-Gilbert

Die für die Sequenzierung notwendigen Prozeduren wie Markierung der Fragmenten, Stranstrennung und Sequenzreaktionen wurden der Anleitung von Maxam und Gilbert (1980) entnommen. Markierungen mit $\alpha^{32}\text{P}$ Cordycepin wurden nach der Methode von Tu and Cohen (1980) durchgeführt. Die Auftrennung der Banden fand in Polyacrylamidgelen statt, die nach Garoff and Ansorge (1981) hergestellt wurden.

3.11 Southern-Blot

Das "Blotten" von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter und die Hybridisierung der an den Filter gebundenen, denaturierten DNA mit radioaktiven (nick-translatierten) Fragmenten erfolgte nach der Vorschrift von Southern (1975). Nur die Puffer für die Prähybridisierung, die Hybridisierung und die Waschschrirte wurden entsprechend der Vorschrift von Johnson et al. (1984) geändert.

3.12 Nick-Translation

Für die Nick-Translation wird folgender Ansatz hergestellt:

DNA	0.25 - 1 μg
10x Nicktranslationspuffer	5 μl
dGTP, dGTP, TTP (250 μM)	je 1.5 μl
$\text{P}^{32}\alpha$ dATP	10 μCi
DNA PolymeraseI	1 U
H_2O Quarz dest.	ad 50 μl

und 2h bei 18 °C inkubiert.

Die Reaktion wird mit 5 μl 0.5 M EDTA pH 8 gestoppt und das Enzym 10 min bei 60 °C inaktiviert. Zur Abtrennung der nicht eingebauten Triphosphate wird die markierte DNA mit 25 μl NH_4Ac 7.5 M und 105 μl Isopropanol bei -20 °C für 30 min gefällt. Nach 10 min Zentrifugation wird das Pellet mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 μl TE aufgenommen.

3.13 Auftrennung von intakten Hefechromosomen in der OFAGE

Die Methode der Isolierung ganzer Chromosomen und der Auftrennung in der OFAGE (orthogonal field alternation gel electrophoresis) wird in den Arbeiten von Carle und Olson (1984, 1985) beschrieben.

3.14 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA aus Hefe wurde nach der Methode von Chirgwin et al. (1979) isoliert.

3.15 In vitro Translation hybrid-selektierter RNA

Die Methoden für die in vitro Translation hybrid-selektierter RNA werden in folgenden Arbeiten beschrieben: Hybrid-Selektion: Ricciardi et al.(1979); in vitro Translation: Jackson und Hunt (1983); Autoradiographie: Chamberlain (1979).

3.16 Northern-Analyse

Die Northern-Analyse wurde nach der Methode von Thomas (1983) durchgeführt.

3.17 Kartieren der 5'-Enden von DNA mit S1-Mapping

Hierbei wurde nach dem Protokoll von Bonitz et al. (1982) vorgegangen.

3.18 Proteinchemische Methoden

3.18.1 Präparation von Hefezellextrakten

Die benützte Methode wird von Yaffe und Schatz (1984) beschrieben.

3.18.2 Western-Blot

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Vorschrift von Laemmli (1970) angefertigt. Der Transfer der Proteine auf einen Nitrozellulosefilter und die darauf folgende Immundekoration der Proteine wird von Haid und Suissa (1983) beschrieben. Geändert wurde nur der Puffer, in dem die Absättigung des Filters, die Inkubation mit dem Antikörper und dem Protein A und alle Waschschritte durchgeführt wurden ("Blotto" nach Johnson et al., 1984). Der letzte Waschschritt, bevor der Filter getrocknet und der Film aufgelegt wird, wird in 1x TBS durchgeführt, da sonst

der Filter brüchig wird.

"Blotto":	Fettfreies Milchpulver	1%
	TBS	1x
TBS 1x:	Tris HCl pH 7.4	50 mM
	NaCl	150 mM
	NaN ₃	0.1 %

4. Ergebnisse

4.1 Einleitung

Die Verfügbarkeit genetisch und biochemisch gut charakterisierter Mutanten sowie die Möglichkeit, Plasmid-DNA ohne große Schwierigkeiten in Hefe einzuführen und zu exprimieren (Hinnen et al., 1978), hat es in jüngster Zeit ermöglicht, eine Vielzahl von Hefegenen durch genetische Komplementation zu identifizieren und zu isolieren.

Das Transformationsvermögen von Hefezellen unterliegt einem polygenischen Erbgang, d.h. verschiedene Gene tragen zur Aufnahme der Fremd - DNA bei. Im ungünstigsten Fall bedeutet dies, daß keine DNA eingeschleust werden kann. Vorversuche in der Arbeitsgruppe (Dr.A.Haid, pers. Mitteilung) erbrachten als Befund, daß dies bei den Cytochrom c_1 -defekten Mutanten der Fall war. Darüber hinaus besaßen die Mutanten keinen geeigneten genetischen Marker, der nach der Transformation das Vorhandensein von Plasmid-DNA in den Zellen signalisiert (siehe unter 3.3). Es war deshalb zu Beginn der Arbeit nötig, die ausgewählten Mutanten, welche die größte Wahrscheinlichkeit zur Isolierung des Strukturgens boten (siehe Einleitung), mit gut transformierbaren und mit geeigneten genetischen Markern versehenen Hefestämmen zu kreuzen und nach Sporulation der Diploiden nach haploiden Nachkömmlingen mit dem gewünschten Phänotyp zu suchen.

4.1.1. Konstruktion transformier- und selektierbarer Mutanten

Die Kreuzung erfolgte - je nach Paarungstyp der Mutanten - mit den isogenen Stämmen AH33 (MAT α) bzw. AH22 (MATa), die sehr gut transformierbar sind, eine Doppelmutation im LEU2-Gen tragen und Canavanin-resistent sind. Nach der Sporulation wurden durch

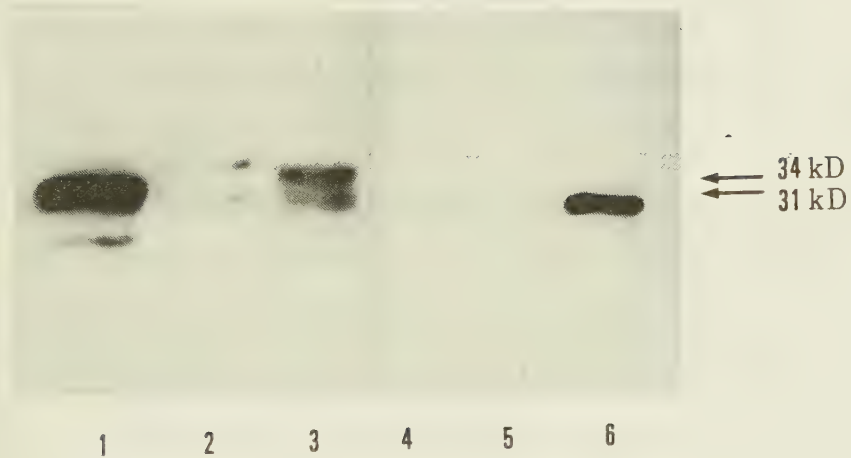
Canavanin-Selektion (siehe Methoden 3.1) atmungsdefekte leu2⁻-Sporennachkommen isoliert. Diese Haploiden wurden noch auf weitere Auxotrophien getestet und außerdem einem sogenannten ϕ Test (siehe Methodenteil 3.1.1) unterzogen d.h. es wurde geprüft, ob die Atmungsdefizienz nur auf die Mutation im Kern (pet⁻) zurückzuführen war oder ob zusätzliche spontane Mutationen in den Mitochondrien aufgetreten waren. Letzteres führt zu einer Doppelmutation, die das gleiche phänotypische Bild der Atmungsdefizienz ergibt. Solche Doppelmutanten waren für die weiteren Versuche auszuschließen, da sie nicht komplementiert werden können.

Haploide Zellen, die diesen Test bestanden, wurden mit Plasmid-DNA auf ihre Befähigung zur Transformation getestet und diejenigen mit der höchsten Transformationsrate daraufhin untersucht, ob sie den ursprünglichen Phänotyp besitzen.

4.2 Analyse des Mutantenphänotyps

Mit Hilfe der Tieftemperaturspektalanalyse an ganzen Hefezellen (Lang and Kaudewitz, 1982) wurde bestimmt, ob die umgekreuzten Stämme den spezifischen Cytochrom c₁-Ausfall (Fehlen der Absorptionsbande bei 594 nm und 170K) aufweisen. Im positiven Fall wurde darüberhinaus geprüft, ob sie nach Western-Analyse entweder die charakteristische Akkumulation der I-Form zeigen bzw. sich kein immunpräzipitierbares Cytochrom c₁ nachweisen läßt (siehe Einleitung).

Dazu wurden von den umgekreuzeten Mutanten Zellextrakte angefertigt und die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Polypeptidbanden wurden elektrophoretisch auf Nitrozellulosefilter transferiert, mit monospezifischem Antiserum gegen Cytochrom c₁ behandelt und mit ¹²⁵I-Protein A markiert.



Figur 1 : Immunologischer Nachweis von Cytochrom c_1 bei Wildtyp- und Mutantenstämmen
Zellextrakte wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert und einer Western-Blot-Analyse unterworfen (34 kDa = I-Form; 31 kDa = M-Form).

Spuren 1 + 6: wt
Spur 2: Mutante 2006
Spur 3: umgekreuzte Mutante 2006/2
Spur 4: Mutante 1165
Spur 5: umgekreuzte Mutante 1165/11

Fig.1 zeigt das Autoradiogramm eines solchen Versuchs. Der Wildtyp (Spur 1) besitzt nur die reife Form des Cytochroms c_1 (M-Form, 31 kDa), die umgekreuzte Mutante 2006/2 akkumuliert zusätzlich die intermediäre Form (I-Form, 34 kDa), während sich bei der umgekreuzten Mutante 1165/11 keine der Cytochrom c_1 -Formen nachweisen läßt. Diese beiden Muster sind identisch zu den von Schwieters (1981) beschriebenen der Ausgangsmutanten 2006 und 1165. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß der ursprüngliche Mutantenphänotyp nach der Kreuzung erhalten geblieben war.

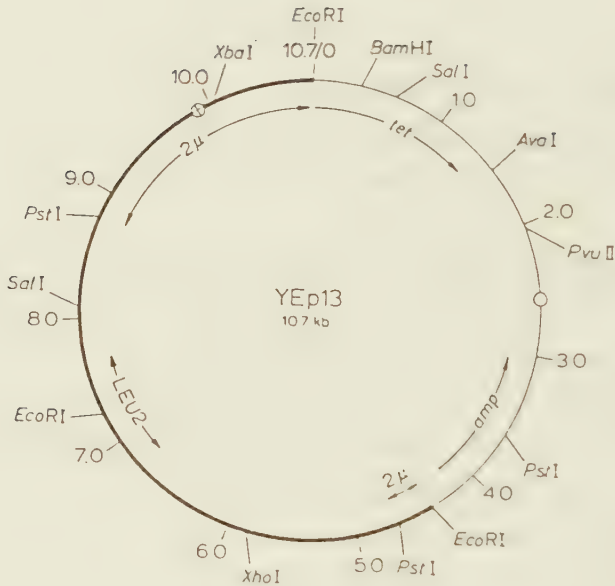
4.3 Transformation der Mutante 2006/2 mit einer genomischen Hefegenbank

Das Cytochrom c_1 -Strukturgen sollte mit Hilfe der Hefetransformationsmethode isoliert werden. Zur Transformation wurde die umgekreuzte Mutante 2006/2 ausgewählt, da sie eine geringe Reversionsrate zur Atmungskompetenz (10^{-8}) zeigte und sehr gut transformierbar war. Die Genbank mit Fragmenten chromosomaler Hefe-DNA wurde von Dr.A.Haid und Dr.M.Suissa konstruiert. Zu ihrer Herstellung wurden Hefe-DNA des Stammes 1273/10B mit Bam HI partial verdaut und Fragmente zwischen 10- und 15 kb in die einzige Bam HI Restriktionsstelle des Hefe-E.coli -Vektors YEpl3 (Broach et al., 1979; Fig.2) kloniert. Dieser Vektor ist ein "shuttle"-Plasmid, d.h. er vermehrt sich sowohl in Hefe als auch in Bakterien autonom. In Hefezellen wird er repliziert, da er einen Teil des endogenen 2μ Hefe-Plasmids mit dem Replikationsorigin enthält; als selektierbarer Marker in Hefe dient das Wildtyp-LEU2-Gen. Zur Replikation und Selektion in Bakterien befähigt der aus dem Plasmid pBR322 stammende Teil, der einen Replikationsorigin sowie die Ampicillin- und

Tetrazyklinresistenzgene (Amp-Gen und Tet-Gen) enthält.

Da pet^- -Mutanten nicht auf Medien, die Ethanol oder Glycerin enthalten, wachsen können, sollte es theoretisch möglich sein, die funktionelle Komplementation der pet^- -Mutation sowie der leu2^- -Mutation nach Transformation in einem einzigen Selektionsschritt durchzuführen (auf Glycerinmedium ohne Leucin). Da aber unbekannt war, mit welcher Rate das Plasmid-kodierte Wildtyp-Produkt das defekte Cytochrom c_1 ersetzen würde, wurde die Selektion der Kotransformanten (LEU2^+ , PET^+) in zwei experimentell unabhängigen Schritten durchgeführt (O'Malley, 1982).

Im eigentlichen Transformationsexperiment wurden 5×10^9 Sphäroplasten mit $30 \mu\text{g}$ DNA der Bam HI Hefe-Genbank inkubiert. Die transformierten Zellen des Ansatzes wurden mit Regenerationsagar (Minimalmedium = WO-Leu) in leere Petrischalen gegossen und bei 30°C inkubiert; auf jeder Platte erschienen nach 3 Tagen mehrere tausend sehr kleiner Kolonien. Die Transformanten wurden aus dem Agar wie bei O'Malley (1982) beschrieben suspendiert und in WO-Leu Medium 1-2 Stunden angezüchtet. Aus dieser Kultur wurden je ca. 10^7 Zellen auf mehrere Glycerinplatten plattiert und bei 30°C weiter - inkubiert. Nach 3-4 Tagen waren auf jeder Platte ca. 200 Kolonien angewachsen. Diese wurden, um Revertanten auszuschließen, noch einmal auf den Besitz des LEU2^+ -Markers getestet, jene mit dem LEU^+ -, PET^+ -Phänotyp abisoliert und wie unten beschrieben weiter untersucht. Alternativ war es auch möglich, die Leu^+ -Transformanten nach der Suspendierung aus dem Agar direkt auf WO-Leu Platten zu verteilen (wieder ca. 10^7 Zellen / Platte) und den dichten Heferasen, der nach einem Tag erschien, auf Glycerinplatten zu überstempeln.



Figur 2 : Restriktionskarte des Hefe- *E. coli* -Vektors YEpl3. Die Hefesequenzen sind mit einem dicken Strich gekennzeichnet. Sie enthalten das *LEU2*-Gen als selektierbaren Marker und einen Teil des 2μ Plasmids mit dessen Replikationsorigin (⊙). Der *E. coli*-Anteil (dünne Linie) besteht aus dem vollständigen pBR322-Plasmid.

Auch bei dieser Methode wuchsen dann nach 2 Tagen ca.200 Kolonien.

Es war auf jeden Fall die Selektion in zwei Schritten notwendig, d.h. es mußte zuerst das LEU2-Gen des YEp13 und dann das transformierte PET⁺-Gen exprimiert werden. Eine Plattierung des Transformationsgemisches sofort auf WO-Leu+Gly- oder Gly-Agar ergab keine PET⁺-Transformanten. Nach unserer Schätzung hat das Wildtyp-Produkt das defekte Genprodukt erst nach 15-20 Generationen vollständig verdrängt.

4.3.1 Mitotische Segregation

Da die isolierten Kolonien auf Medium ohne Leucin wachsen können, enthalten sie mit größter Wahrscheinlichkeit das LEU2-tragende YEp13-Plasmid. Revertanten zu LEU⁺ waren kaum zu erwarten, da die Reversionsrate der leu2⁻-Doppelmutation zum Wildtyp im Empfängerstamm ca. 10^{-8} - 10^{-10} beträgt. Anders ist dies im Falle des auftretenden PET⁺-Phänotyps. Dieser kann durch Transformation aber auch durch Reversion bedingt sein, da Reversions- und Transformationsraten etwa gleich groß (ca. 10^{-4} - 10^{-5}) sind.

Um sicher zu gehen, daß echte Transformanten vorlagen und nicht Revertanten, wurden 13 der LEU⁺-, PET⁺-Kolonien einer Segregationsanalyse unterzogen. Dieses Experiment basiert auf dem Befund, daß Plasmide bei Wachstum der Hefen in Vollmedium verlorengehen, da kein Selektionsvorteil für Plasmid-tragende Zellen gegeben ist. Der Verlust des Plasmids einer echten Transformante ist gekennzeichnet durch den gleichzeitigen Ausfall der beiden Plasmid-gebundenen Marker. Sie sollte deshalb sowohl vom LEU⁺- zum leu⁻-Phänotyp als auch vom PET⁺- zum pet⁻-Phänotyp wechseln.

Revertanten können ebenfalls leicht diagnostiziert werden; hier ist Erhalt oder Verlust von LEU^+ nicht koordiniert mit Erhalt oder Verlust des PET^+ -Markers.

Das Ergebnis der Analyse ist in Tab.1 dargestellt. Alle 13 getesteten Transformanten behielten bzw. verloren den LEU^+ -, PET^+ -Phänotyp gleichzeitig. Nach etwa 15 Generationen zeigen in der Regel mehr als zwei Drittel aller Zellen einen leu^- -, pet^- -Phänotyp. Dieses Verhalten ist typisch für autonom replizierende Plasmide. Das Ergebnis schließt somit die Möglichkeit der Reversion aus und beweist das Vorliegen echter Transformanten.

Transf.	YPD	Glyzerin Vollmedium	WO-Leu	Verlust/ 15 Generationen
1	99	4	4	96%
2	54	9	9	83.4%
3	163	20	20	87.8%
4	147	26	26	82.4%
5	52	5	5	90.6%
6	69	17	16	82.9%
7	69	8	8	88.5%
8	78	9	9	88.5%
9	98	16	16	83.7%
10	109	12	12	68.9%
11	138	43	45	68.9%
12	188	52	61	71.9%
13	161	60	64	62.8%

Tabelle 1 : Mitotische Segregation des $LEU2^+$ - und PET^+ -Markers

Die LEU^+ -, PET^+ -Transformanten wurden für ca. 15 Generationen in YPD Medium angezogen. Aus jeder Kultur wurden 50 - 200 Einzelkolonien auf YPD Platten plattiert und nach 2 Tagen auf Glyzerin und WO-Leu Platten gestempelt. Die Zahlen (bei YPD, Glyzerin und WO - Leu) geben die Anzahl der Kolonien wieder, die auf den einzelnen Platten gewachsen sind. In der letzten Spalte steht der gemeinsame Verlust beider Marker nach 15 Generationen in Prozent.

4.3.2 Plasmid-DNA-Isolierung aus Hefe-Transformanten und Rücktransformation

Einen zusätzlichen Beweis dafür, daß die pet^- komplementierende Eigenschaft Plasmid-gebunden ist, erhält man nach erneuter Transformation des aus Ersttransformanten rück-isolierten Plasmids in verschiedene Cytochrom c_1 -Mutanten der Komplementationsgruppen I und II. Bei Mutanten der Gruppe I, die ein anderes Gen betreffen, dürfte nach den Vorhersagen keine Komplementation der Atmungsdefizienz stattfinden; alle Mutanten der Gruppe II hingegen sollten komplementierbar sein. Es müßten in diesem Fall alle LEU^+ -Transformanten gleichzeitig auch PET^+ sein (bei der Ersttransformation mit der Gesamtgenbank waren nur sehr wenige der LEU^+ -Transformanten ebenfalls PET^+).

Für dieses Experiment mußte zuerst Plasmid-DNA in genügend großer Menge isoliert werden. Da aus Hefetransformanten nur geringe Mengen Plasmid-DNA isoliert werden können, wurde die DNA zunächst in E.coli transformiert und amplifiziert und daraus dann DNA im Großmaßstab isoliert.

Zwölf Hefetransformanten, die im mitotischen Segregations-experiment positiv waren, wurden ausgewählt, in 40 ml YPD-Medium über Nacht angezogen und daraus, wie im Methodenteil beschrieben, Gesamt-DNA isoliert. Mit dieser DNA wurden kompetente E.coli-Zellen des Stammes SF8 transformiert und auf Ampicillinplatten ausplattiert.

Wie in Fig.2 zu sehen ist, wird bei der Klonierung eines DNA-Fragmentes in die Bam HI Schnittstelle des Plasmids YEpl3 - wie sie bei der Konstruktion der Genbank erfolgt ist - das Tet-Gen zerstört, während das Amp-Gen unversehrt bleibt. E.coli-Zellen, die ein Plasmid mit Fragment erhalten haben, können also

auf Ampicillin wachsen, nicht aber auf Tetrazyklin.

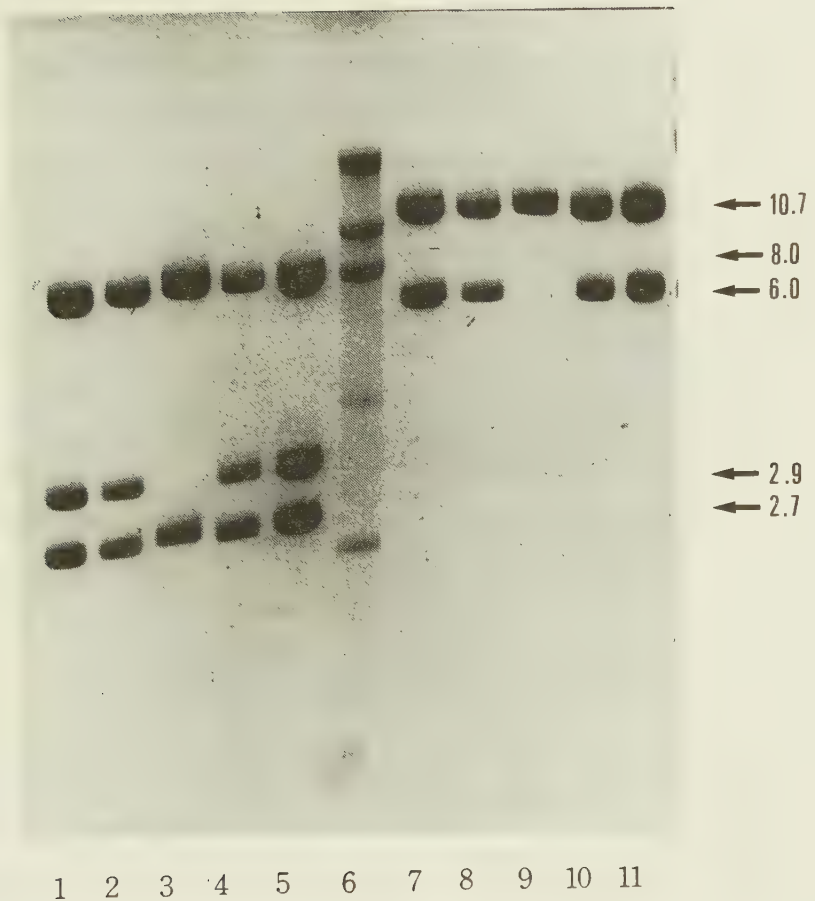
Acht Amp^r-resistente und Tet^s-sensitive Klone wurden ausgewählt und weiter untersucht. Mit der Methode der schnellen Plasmidpräparation nach Birnboim (Methodenteil 3.3.2) wurde aus den E.coli-Transformanten Plasmid-DNA isoliert und diese zusammen mit YEp13 ohne Fragment nach Restriktionsverdau mit Bam HI auf ein Agarosegel aufgetragen. Man erkennt in Fig.3, in der vier der acht Klone gezeigt werden, daß alle Plasmide ein DNA-Fragment von ca. 6000 bp besitzen. Weitere Restriktionsverdau mit Dgl II, Pvu II (nicht gezeigt) und Eco RI (nicht gezeigt) ergeben, daß die untersuchten Klone identisch sind (Fig.3).

Die Isolierung identischer Klone ließ sich auf folgende Weise erklären: Durch die Suspendierung des Agars, der die Transformanten enthielt, fand eine gleichmäßige Verteilung der Zellen statt; wenn also nur eine PET⁺-Transformantenkolonie existierte, führte die Methode zu sehr vielen einzelnen positiven Zellen, die bei der Plattierung auf selektive Medien wieder eigene Kolonien bildeten.

Aus den vier Klonen wurde mit einer Grobpräparation nach Birnboim genügend DNA isoliert, um damit Rücktransformationsversuche durchführen zu können. Die dabei gewonnenen Plasmide haben die Bezeichnung YEp13-41, -42, -43, -44.

Die bereits bei der Ersttransformation eingesetzte Mutante 2006/2 wurde mit allen vier Klonen transformiert. Erwartungsgemäß zeigte sich in den vier Fällen das gleiche Verhalten, d.h. nahezu alle LEU⁺-Transformanten waren auch PET⁺ (Tab.2a).

Die Rücktransformation in die anderen Mutanten der Komplementationsgruppe II wurde nur noch mit dem Plasmid YEp13-41 durchgeführt, da YEp13-41 bis -44 identisch waren (Tab.2b).



Figur 3 : Restriktionsanalyse von komplementierenden Plasmiden.
Aus positiven Hefetransformanten wurde DNA gewonnen, in *E.coli*-Zellen transformiert und amplifiziert. Die aus den Bakterienzellen isolierte Plasmid-DNA wurde mit Bam HI und Bgl II geschnitten.

Spuren 3 und 9: YEp13 (Kontrolle)

Spuren 1,2,4,5: Bgl II Verdau von YEp13-41,-42,-43,-44

Spuren 7,8,10,11: Bam HI Verdau der Plasmide in gleicher Reihenfolge

Spur 6: DNA-Längenstandard (DNA des Phagen P22 mit Eco RI geschnitten: 19.9 kb, 9.4 kb, 7.3 kb, 4 kb, 2.4 kb, 1.15 kb, 1.1 kb, 0.8 kb)

Wie nach der Ersttransformation wurden einige Transformanten zur Revertantenkontrolle einer mitotischen Segregation unterzogen. In allen untersuchten Fällen fand Cosegregation des LEU2⁺ und des PET⁺-Markers statt.

Aus der Komplementationsgruppe I wurden 3 Stämme mit YEp13-41 transformiert. In diesem Fall blieben alle LEU⁺-Transformanten atmungsdefizient, d.h. eine Komplementation der Mutation(en) dieser Gruppe durch das Fragment des Plasmids war nicht möglich (Tab.2c).

Dieses Ergebnis bestätigt nachträglich die genetische Einteilung der Mutanten in zwei Komplementationsgruppen.

Plasmid	WO-Leu Platte	Glyzerinplatte
YEp13-41	66	66
YEp13-42	37	37
YEp13-43	50	48
YEp13-44	58	57

Tab.2a : Rücktransformation in die Mutante 2006/2. Die LEU⁺-Transformanten wurden auf Glyzerinplatten gestempelt.

Stamm	WO-Leu Platte	Glyzerinplatte
2024/2	100	94
005/2	200	200
1167/7	16	16

Tab.2b : Rücktransformation in 3 andere Stämme der Komplementationsgruppe II mit dem Plasmid YEp13-41. Die LEU⁺-Transformanten wurden auf Glyzerinplatten gestempelt.

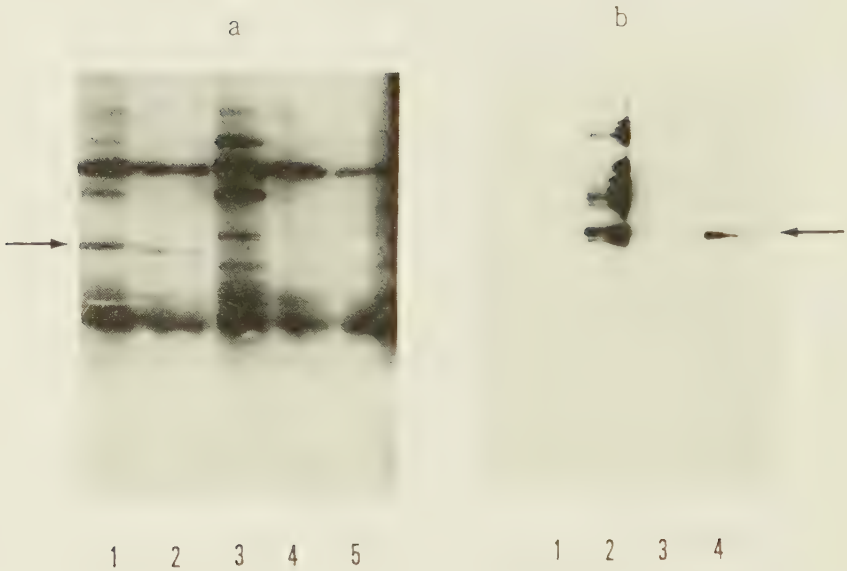
Stamm	WO-Leu	Glyzerinplatte
1302	70	0
0526	60	0
3101	60	0

Tab.2c : Rücktransformation in 3 Stämme der Komplementationsgruppe I mit dem Plasmid YEp13-41. Die LEU⁺-Transformanten wurden auf Glyzerinplatten gestempelt.

3.3 In vitro-Translation mit hybrid - selektierter RNA

Die bisher beschriebenen Versuche beweisen, daß die Information, die den Mutanten wieder zur Atmungskompetenz verhilft, auf dem Plasmid YEp13-41 lokalisiert ist. Das 6000 bp Fragment dieses Plasmids muß allerdings nicht notwendigerweise das Cytochrom c_1 -Strukturgen enthalten, da auch intergenische Suppression der Mutation zum gleichen Ergebnis der Komplementation führen kann. Ein Nachweis, daß auf dem Fragment wirklich das Strukturgen und kein Suppressorgen kodiert ist, war leicht zu führen, da Cytochrom c_1 -Antikörper zur Verfügung standen (Biozentrum Basel, Gruppe Prof. Schatz). DNA des Plasmids YEp13-41 wurde an Nitrzellulosefilter gebunden und mit Gesamt-RNA aus Hefe hybridisiert. Nachdem die ungebundene RNA abgewaschen worden war, wurde die an die DNA des Klons YEp13-41 spezifisch gebundene RNA eluiert. Diese wurde im Reticulocytenlysat translatiert; zur Markierung wurde ^{35}S -Methionin verwendet. Die Hälfte des Translationsansatzes wurde zur Größenbestimmung auf einem Gel aufgetrennt. Das Autoradiogramm (Fig. 4a) zeigt in den Spuren 1 und 2 neben den Banden, die für das Plasmid YEp13 selbst charakteristisch sind, eine zusätzliche Bande mit einer Größe von ca. 31 000 Da, die nach dem Laufverhalten dem Cytochrom c_1 -Genprodukt entsprechen könnte.

Die zweite Hälfte des Ansatzes wurde mit Cytochrom c_1 -Antiserum immunpräzipitiert und ebenfalls elektrophoretisiert. Auf dem Autoradiogramm erscheint nur die Bande mit der Größe von ca. 31 000 Da (Fig. 4b, Spur 4). Dieses Ergebnis beweist eindeutig, daß das Fragment von YEp13-41 das Cytochrom c_1 -Strukturgen trägt.



Figur 4 : Identifizierung des Cytochrom c_1 -Gens

a): In vitro Translation hybrid-selektierter Hefe-mRNA vor Immunpräzipitation: RNA selektierende DNA-Proben waren die Plasmide YEpl3-41 (komplementierend), YEpl3 und pBR322 (Kontrollen). Nach in vitro Translation wurden die Translationsprodukte auf einem 12,5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert.

- Spur 1: YEpl3-41
- Spur 2: Fragment 41
- Spur 3: YEpl3
- Spur 4: pBR322
- Spur 5: ohne DNA

b): Nach Immunpräzipitation: Nach der Immunpräzipitation des in vitro Translationsansatzes mit Cytochrom c_1 -Antiserum wurden die Produkte auf einem 12,5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert.

- Spur 1: ohne DNA
- Spur 2: Gesamt-RNA
- Spur 3: YEpl3
- Spur 4: YEpl3-41

→ Cytochrom c_1

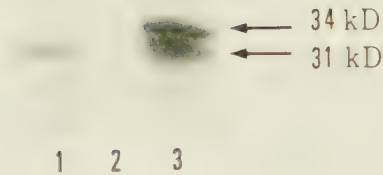
4.3.4 Expression des plasmidgebundenen Cytochrom c_1 -Gens in Hefe

Da eine Komplementation aller Cytochrom c_1 -defizienter Mutanten der Komplementationsgruppe II möglich war, sollte sich auf dem 6000 bp Fragment des Plasmids YEp13-41 das ganze Gen befinden. Die hohe Transformationsrate sowie die Befunde der mitotischen Segregation schlossen die Möglichkeit einer Einrekombination von Teilen des Wildtyp-Strukturgens in das Chromosom aus. Eine weitere Bestätigung und außerdem ein Beweis dafür, daß sich auch alle notwendigen cis-wirksamen Signalsequenzen auf dem Fragment befanden, ergaben die Experimente zur in vivo-Expression in Hefe.

Die Hefemutante 1165/11 wurde mit dem Plasmid YEp13-41 transformiert und aus Transformanten Zellextrakte gewonnen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Sie wurden mit Cytochrom c_1 -Antiserum immundekoriert und mit Protein A markiert. In Spur 3 von Fig.5 sieht man das immunologisch nachweisbare Cytochrom c_1 -Protein. Die Überexpression in Hefe (siehe auch 4.8) ist auf die Expression vieler Cytochrom c_1 -Kopien des "multi copy number"-Plasmids YEp13 zurückzuführen (Botstein und Davis, 1982).

4.4 Charakterisierung des Plasmids YEp13-41 und Subklonierung

Vom 6000 bp Fragment wurde zunächst eine grobe Restriktionskarte hergestellt, d.h. es wurden nur Restriktionsenzyme mit hexamerer Erkennungssequenz benutzt. Die Schnittstellen wurden sowohl am ganzen Plasmid (wichtig für die Orientierung des Fragments im Plasmid) als auch am Fragment allein bestimmt.

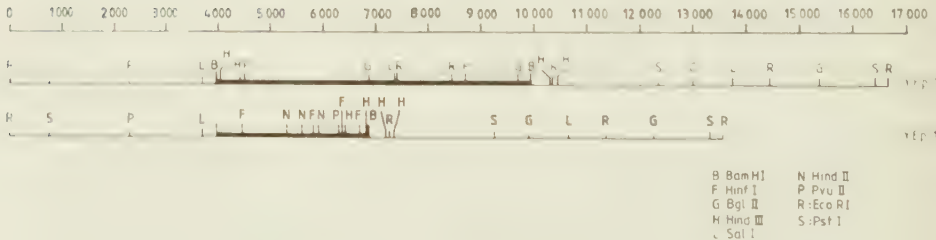


Figur 5 : In vivo - Expression von Cytochrom c_1 in Hefe - mutanten. Aus der mit YEp13-41 transformierten Mutante sowie aus der untransformierten Mutante und dem Wildtyp wurden Zell - extrakte gewonnen und diese einer Western-Blot-Analyse unterworfen.

Spur 1: wt

Spur 2: 1165/11 untransformiert

Spur 3: 1165/11 transformiert mit Yep13-41



Figur 6 : Restriktionskarte der 2 Plasmide YEp13-41 und YEp13-41/1. Das Fragment ist durch die dicke Linie gekenn - zeichnet, der Vektor durch die dünne Linie. Die obere Skala gibt die Zahl der Basenpaare an.

In Fig.6 oben sind die Restriktionsstellen für die Enzyme Bam HI (2), Hind III (2), Pvu II (2), Sal I (1), Bgl II (2), Eco RI (2) dargestellt. In der Mitte des Fragments liegen die Schnittstellen von Sal I und Eco RI sehr nahe beieinander; die exakte Position war deshalb mit den hier verwendeten Methoden nicht eindeutig festzulegen.

Das nächste Ziel war, das Cytochrom c_1 -Gen zu sequenzieren. Da nur das 6000 bp Fragment 41 vorlag, aus dem Molekulargewicht des Proteins (31 000) aber auf eine Gengröße von ca. 1000 bp geschlossen werden konnte, wurde das Fragment verkleinert. Als sehr gut geeignet für einen ersten Subklonierungsversuch erschien die Bgl II Restriktionsstelle, die ziemlich genau in der Mitte des Fragments liegt. Von Vorteil war darüber hinaus, daß Bgl II Enden wieder in Bam HI Restriktionsstellen kloniert werden können, da beide Enzyme Isocaudamere darstellen.

Das Fragment 41 wurde aus dem Plasmid YEp13-41 isoliert und mit Bgl II nachgeschnitten. Dieses Fragmentgemisch (zwei große Fragmente von ca. 3000 bp und ein sehr kleines Fragment von ca. 400 bp) wurde mit Bam HI geschnittenem, phosphatasebehandeltem Vektor YEp13 ligiert. Das ganze Ligationsgemisch wurde dann ohne weitere Behandlung in die Hefemutante 2006/2 transformiert. Das Ergebnis zweier Transformationen zeigt die Tabelle 3.

	WO-Leu Platte	Glyzerinplatte
Ligationsansatz A	100	32
Ligationsansatz B	100	23

Tab.3 : Die Mutante 2006/2 wurde mit einem Ligationsgemisch aus YEp13 und Bgl II Fragmenten transformiert. Je 100 der LEU⁺-Transformanten wurden auf eine WO-Leu Platte gepickt und nach 2 Tagen Wachstum auf eine Glyzerinplatte gestempelt. Die Zahlen geben die Anzahl der gewachsenen Kolonien an.

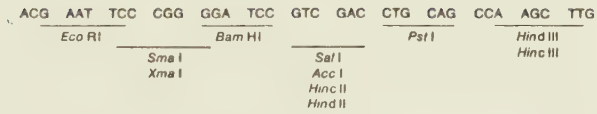
Aus vier positiven Hefetransformanten (LEU^+ , PET^+) wurde nach Ausschluß von Revertanten mittels mitotischer Segregationsanalyse Gesamt-DNA isoliert und diese in E.coli -Zellen transformiert. Nur eine der Transformanten zeigte ein Fragment der erwarteten Größe von ca. 3000 bp.

Plasmid-DNA dieser Transformante wurde wiederum in die Hefemutante 2006/2 eingeführt. Von den 84 LEU^+ -Transformanten, die erhalten wurden, waren 81 PET^+ , d.h. das subklonierte Fragment enthält auf jeden Fall das ganze Cytochrom c_1 -Gen. Für dieses Fragment (im folgenden 41/1 genannt) wurde noch eine genauere Kartierung mit den Restriktionsenzymen Hinf I und Hind II (pentamere Erkennungssequenz) durchgeführt (Fig.6 unten) und die Größe des Fragments mit 2900 bp bestimmt. Auf eine weitere Kartierung wurde verzichtet, da geplant war, mit dem ganzen Fragment eine "shotgun"-Klonierung in M13-Phagen durchzuführen. Dafür war es unnötig, weitere Restriktionsstellen zu kennen.

4.5 DNA - Sequenzierung

4.5.1 Shotgun-Klonierung in mp8

Die Sequenzierung des 2900 bp Fragments wurde nach der Dideoxymethode von Sanger mit Hilfe von M13-Klonen durchgeführt. Die M13-Phagen mit Subfragmenten wurden durch eine "shotgun"-Klonierung gewonnen. Dazu wurde das Fragment 41/1 in vier verschiedenen Restriktionsansätzen mit je einem Restriktionsenzym, das eine tetramere Erkennungssequenz hat, geschnitten. Als Enzyme wurden Alu I, Hae III, Sau 3A I, und Taq I gewählt, da Fragmente mit von diesen Enzymen gebildeten Enden in Restriktionsstellen der Polylinker-Region (kurzer DNA-Bereich mit mehreren, im Plasmid nur einmal vorkommenden Restriktionsschnittstellen) des Phagen mp8 kloniert werden können (Fig.7).



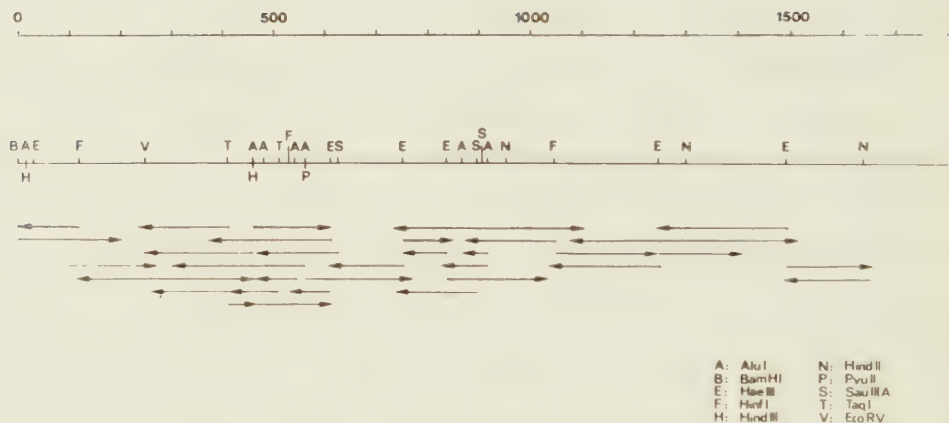
Figur 7 : Polylinker-Region des M13-Phagen mp8.

Wie ein Testverdau zeigte, produzierte jedes der vier Enzyme sehr viele kleine Fragmente, so daß damit zu rechnen war, verschiedene, sich überlappende Subfragmente zu erhalten. Für die Klonierung wurde replikative DNA des Phagen mp8 isoliert und mit Bam HI (für Sau 3A I), Sma I (für Alu II und Hae III) bzw. Acc I (für Taq I) geschnitten. Die vier Restriktionsansätze des 2900 bp Fragments wurden phenolisiert und dann mit passend geschnittener Phagen-DNA ligiert. Die Ligationsgemische wurden in kompetente Zellen des Stammes JM101 transformiert und mit X-Gal und IPTG auf LB-Platten plattiert (siehe Methoden 3.8.2). Zusätzlich wurden weitere Fragmente durch Ultraschall-Behandlung des 2900 bp-Fragments erzeugt. Dazu wurde DNA des Fragments 41/1 dreimal eine Minute lang beschallt und die Effizienz der Behandlung auf einem Testgel geprüft. Zur Erzeugung von stumpfen Enden wurden die Fragmente im Gemisch mit T4-DNA-Polymerase und dNTP's aufgefüllt. Nach der Auffüllreaktion wurde das Gemisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, Bereiche verschiedener Fragment - größen (200-500 bp, 500-900 bp, >900 bp) ausgeschnitten und die DNA eluiert. Diese DNA wurde mit Sma I geschnittenem Vektor ligiert und in JM101 transformiert. Alle weißen Plaques wurden isoliert und die Phagen in JM101 Bakterien vermehrt. Aus diesen Kulturen wurde einzelsträngige Phagen-DNA gewonnen, die dann in die Sequenzierung eingesetzt werden konnte.

4.5.2 Sequenzierung nach Sanger (1977, 1980)

Bei einer "shotgun" - Sequenzierung ist die Chance, zunächst viele Klone mit nicht identischen Fragmenten zu bekommen, sehr groß. Es konnte beobachtet werden, daß bestimmte Fragmentregionen unter den Klonen bevorzugt auftauchten, während andere total

fehlten. Außerdem fiel auf, daß die meisten Fragmente nur in einer Orientierung einkloniert wurden. Die Ursache dieser Polarität ließ sich nicht aufklären. Nachdem mehr als 100 Klone sequenziert waren, konnten die Sequenzen zu längeren Stücken zusammengefügt werden. Allerdings traten noch einige größere Lücken auf. Die bereits bekannten DNA-Sequenzen wurden per Computer in allen sechs möglichen Leserahmen in die Aminosäuresequenz überschrieben. Dabei wurde bei einer Sequenz die Aminosäurefolge Cys X X Cys His gefunden. Diese Sequenz, die auf eine Hämbindungsstelle hinweist, ist für fast alle bisher bekannten Cytochrome charakteristisch. Die Partialsequenz, die diese Bindungsstelle enthielt, wurde dann mit der schon bekannten Aminosäuresequenz von Rinderherz-Cytochrom c_1 verglichen in der Annahme, daß Homologien auf Proteinebene vorhanden sein sollten. Tatsächlich wurden auch solche Homologien gefunden. Nach diesem Befund konnte die weitere Sequenzierarbeit auf die rechte und linke Seite dieses Fragmentes konzentriert werden. Durch gezielte Klonierung von flankierenden Fragmenten wurden die vorhandenen Lücken geschlossen und der Rest des protein - kodierenden Bereiches, sowie 360 bp der 5'-nicht- kodierenden Region und 300 bp der 3'-nicht-kodierenden Region sequenziert. In Fig.8 und 9 sind Sequenzstrategie und die ermittelte Nukleotidsequenz dargestellt.



Figur 8 : Sequenzstrategie.

Das 1500 bp-Fragment des Plasmids YEp13-41/1 wurde isoliert und mit den angegebenen Restriktionsenzymen in kleinere Fragmente geschnitten. Diese wurden in den M13-Phagen mp8 entweder durch "shotgun"-Klonierung (Sau 3A I, Alu I, Hae III, Taq I) oder durch direkte Klonierung integriert.

Die obere Skala gibt die Anzahl der Basenpaare an; in der Mitte sieht man die Restriktionsstellen des Fragments, die für die Sequenzierung benutzt worden sind; die Pfeile unten zeigen die Länge und Orientierung der Einzelsequenzen.

ATCCATGACTATCTAAGCTTTTAGTAGAGGCCATTGCTTTTCTTTATTAATCATCGGTTTCACAATCTTTCTTTGTTAAG
-366
CAACATTTTATACATTTTGTACTTTTCTTCAAAATATTAAGGACAAGAAAGAAAAAGAAAGAAATCCATATTCTATAT
TACTGTAACTATTTTTCTAAATATTTTTCCAGTACTCCCCAGTTTGATAAAAAGCATTGTAATTTCCCACACA
TTTGTGATATCTTCAATTGATTAGTTGAAC TAGTTCTGAAAAATAATTTTACAATTTGCATTTTCATTACACTATAT
1
CATCTACTATTTTTTCTCAGAGCGGAAGTTATAACTAATTTGACA MET PHE SER ASN LEU SER LYS ARG
-1 ATG TTT TCA AAT CTA TCT AAA CGT
+1
10
TRP ALA GLN ARG THR LEU SER LYS SER PHE TYR SER THR ALA THR GLY ALA ALA SER LYS
TGG GCT CAA AGG ACC CTC TCG AAA AGT TTC TAC TCT ACC GCA ACA GGT GCT GCT AGT AAA
30
SER GLY LYS LEU THR GLN LYS LEU VAL THR ALA GLY VAL ALA ALA ALA GLY ILE THR ALA
TCT GGC AAG CTT ACT CAA AAG CTA GTT ACA GCG GGT GCT GCT GGC GGC GGT ATC ACC GCA
50
SER THR LEU LEU TYR ALA ASP SER LEU THR ALA GLU ALA MET THR ALA ALA GLU HIS GLY
TCG ACT TTA CTC TAT GCA GAC TCA TTA ACT GCG GAA GCT ATG ACC GCA GCT GAA CAC GGA
70
LEU HIS ALA PRO ALA TYR ALA TRP SER HIS ASN GLY PRO PHE GLU THR PHE ASP HIS ALA
TTG CAC GCG CCA GCA TAT GCT TGG TCC CAC AAT GGG CCT TTT GAA ACA TTT GAT CAT GCA
90
SER ILE ARG ARG GLY TYR GLN VAL TYR ARG GLU VAL CYS ALA ALA CYS HIS SER LEU ASP
TCC ATT AGA AGA GGT TAC CAC GTT TAC CCG TAC GAA GTT TGT GCG GCG TGC CAT TCT CTT GAC
110
ARG VAL ALA TRP ARG THR LEU VAL GLY VAL SER HIS THR ASN GLU GLU VAL ARG ASN MET
AGA GTT GCT TGG AGA ACT TTG GTT GGT GTT TCT CAT ACC AAC GAA GAG GTT CGT AAT ATG
130
ALA GLU GLU PHE GLU TYR ASP ASP GLU PRO ASP GLU GLN GLY ASN PRO LYS LYS ARG PRO
GCC GAA GAA TTT GAA TAC GAT GAC GAA CCT GAT GAA CAA GGT AAG CCT AAA AAG AGA CCA
150
GLY LYS LEU SER ASP TYR ILE PRO GLY PRO TYR PRO ASN GLU GLN ALA ALA ARG ALA ALA
GGT AAG TTG TCC GAT TAC ATC CCT GCG CCA TAC CCA AAC GAA CAG GCT GCA AGA GCT GCT
170
ASN GLN GLY ALA LEU PRO PRO ASP LEU SER LEU ILE VAL LYS ALA ARG HIS GLY GLY CYS
AAT CAA GGT GCC TTG CCA CCT GAT CTA TCT TTG ATC GTG AAA GCT AGA CAC GGT GGT TGT
190
ASP TYR ILE PHE SER LEU LEU THR GLY TYR PRO ASP GLU PRO PRO CTA GLY VAL ALA LEU
GAC TAT ATT TTC TCT TTG TTG ACC GGT TAT CCT GAT GAA CCT CCT GCT GGT GTG GGT TTA
210
PRO PRO GLY SER ASN TYR ASN PRO TYR PHE PRO GLY GLY SER ILE ALA MET ALA ARG VAL
CCA CCA GGT TCT AAT TAT AAC CCT TAC TTC CCA GGT GGT TCC ATT GCA ATG GCA AGA GTC
230
LEU PHE ASP ASP MET VAL GLU TYR GLU ASP GLY THR PRO ALA THR THR SER GLN MET ALA
TTG TTT GAT GAC ATG GTT GAG TAC GAA GAT GCT ACC CCG GCA ACG CAA TCT CAA ATG GCA
250
LYS ASP VAL THR THR PHE LEU ASN TRP CYS ALA GLU PRO GLU HIS ASP GLU ARG LYS ARG
AAG GAC GTT ACC ACC GGT TTT TTA AAC TGG TGT GCG GAA CCT GAA CAT GAC GAA AAG AAG CCA
270
LEU GLY LEU LYS THR VAL ILE ILE LEU SER SER LEU TYR LEU LEU SER ILE TRP VAL LYS
TTG GGT TTG AAA ACG GTG ATA ATC TTA TCA TCT TTG TAT TTG CTA TCT ATC TGG GTG AAG
290
LYS PHE LYS TRP ALA GLY ILE LYS THR ARG LYS PHE VAL PHE ASN PRO PRO LYS PRO ARG
AAG TTC AAA TGG GCG GGT ATC AAA ACC AGA AAA TTC GTT TTT AAT CCA CCA AAA CCA AGA
LYS *** TTGACAAAAAATGAAAAACCATATTATTTAAATTACGGAAAAAACAATAAACAACAAAAACATAAT
AAG TAG
+930
AAAAAGAAATGAAAAAGAATATTAGTAGAGCACTACTGAATTTGTTTTCAGAAAGAGAGTGAAGGTAAACAAAAATTTAC
CTACTTTTCTCTTTTATTTCTCTGGTTCGTTTCTTTTTTTCGGCCACGCTATTTATTTTTCACGTCTGTAAACAAC
GTCTCACTTCAATAGTGCTCTCTTCATGTACTGAGATACTGCTGC
+1572

Figur 9 : Nukleotidsequenz des Cytochrom c₁-Gens und abge -
leitete Aminosäuresequenz des Präkursorproteins. Die Zahlen unter
den Zeilen beziehen sich auf die Nukleotidsequenz, die Zahlen
darüber auf die Aminosäuresequenz. Der Pfeil bezeichnet die
Grenze zwischen der Präsequenz und der reifen Form.

Die sequenzierten 1572 bp wurden im Computer translatiert und ergaben einen durchgehenden Leserahmen von 309 Aminosäuren. Dieses Protein wurde wieder mit dem Rinderherz-Cytochrom c_1 verglichen. Die Homologie der Sequenzen der reifen Proteine beträgt 56.5 %. Da nur die Aminosäuresequenz des reifen Rinderherz-Cytochrom c_1 bekannt war, konnte man im Vergleich die bisher unbekannte Präsequenz des Hefe-Cytochrom c_1 identifizieren. Die Analyse deutete darauf hin, daß das reife Cytochrom c_1 bei Aminosäure 65 - einem Alanin - beginnen würde.

Bei *Neurospora crassa* hatte man bereits vor einiger Zeit den N-Terminus der reifen Form durch Aminosäuresequenzierung bestimmt (Tsugita et al., 1979). Ein Vergleich des Hefe-Cytochroms c_1 mit diesem Teil des Proteins ergibt ebenfalls Homologien; hier allerdings bietet sich als Start für die reife Form des Hefe-Cytochroms c_1 die Aminosäure 62 - ein Methionin - an.

Inzwischen der N-Terminus des reifen Hefe-Cytochrom c_1 bekannt; er beginnt bei Aminosäure 62 (pers. Mitteilung Dr. van Loon) (Fig.10).

Das Molekulargewicht der 61 Aminosäuren langen Präsequenz beträgt 6597 und stimmt damit gut mit dem Wert (ca. 6000) überein, der durch Vergleich der Molekulargewichte der reifen und Präkursor-Form nach SDS-PAGE bestimmt worden ist. Als Molekulargewicht der reifen Form wurden 27 419 ermittelt.

Die ungefähre Übereinstimmung dieses Wertes mit den Elektrophoresedaten (31 000) spricht dagegen, daß in der Sequenz lange Introns vorkommen; diese Ansicht wird zum einen durch das Fehlen typischer Hefe-Splicing-Signale und zum anderen durch die durchgehend hohe Homologie der reifen Form mit Rinderherz-Cytochrom c_1 unterstützt.

[illegible]

Figur 10 : Vergleich der Aminosäuresequenzen von reifem Hefe-Cytochrom c_1 (YC1), reifem Rinderherz-Cytochrom c_1 (BC1) und dem N-Terminus von reifem *N.crassa*-Cytochrom c_1 (NC1).

Ein interessanter Befund ist, daß das Hefe-Cytochrom c_1 am C-Terminus 3 Aminosäuren mehr aufweist als das Rinderherz-Cytochrom c_1 (Fig.10). Möglicherweise werden auch diese 3 Aminosäuren während der Prozessierung der Präkursorform zur reifen Form abgespalten. Nicht auszuschließen ist aber auch die Möglichkeit, daß die bei Rinderherz-Cytochrom c_1 fehlenden Aminosäuren auf einen artifiziellen Verlust während der Isolierung des Polypeptids aus den Mitochondrien zurückzuführen sind.

Eine genauere Besprechung der Sequenz und der Bereiche, die möglicherweise wichtig für die Regulation des Gens und den Import des Proteins sind, erfolgt in der Diskussion.

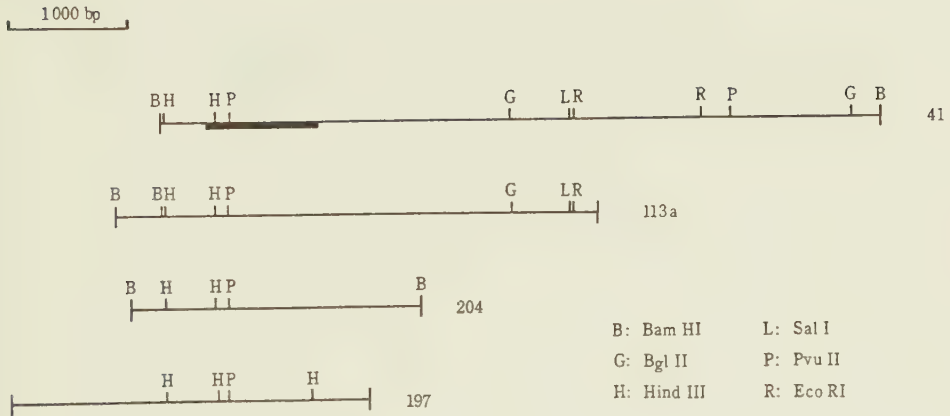
Bennetzen und Hall (1982) konnten in Hefe eine Korrelation zwischen der Menge einer bestimmten mRNA und dem Codongebrauch in ihrem Gen nachweisen. Hochexprimierte Gene (wie z.B. Glyzerin - aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; Alkoholdehydrogenase I) benutzen fast ausschließlich nur 25 von 61 möglichen Triplets. Die Autoren führten zur genaueren Charakterisierung einen "Codon Bias Index" (CBI) ein. Ein Wert von 1 zeigt den Gebrauch von nur 25 Codons an, der Wert 0 bedeutet, daß alle 61 Codons gleich - rangig benutzt werden. Im Cytochrom c_1 -Gen werde 54 Codons benutzt, der CBI ist 0.35. Dieser Wert signalisiert, daß die Menge an produzierter Cytochrom c_1 -mRNA gering ist. Die Aussage steht im Einklang mit dem Befund aus in vitro-Translationsexperimenten (Dr.A.Haid, pers. Mitteilung), wonach unter dereprimierten Bedingungen translatierbare Cytochrom c_1 -mRNA nur 0.01 - 0.02% der Gesamt-mRNA ausmacht (als Vergleich die Werte von Iso-1-Cytochrom c: CBI=0.5; mRNA-Anteil an der Gesamt-mRNA = 0.05% und Iso-2-Cytochrom c: CBI=0.15; mRNA-Anteil an der Gesamt-mRNA = 0.003%).

ASP			LEU			GLY		
	GAT	8		TTA	5		GGT	18
	GAC	7		TTG	12		GGC	2
				CTT	2		GGA	1
ASN				CTC	2		GGG	1
	AAT	6		CTA	4			
	AAC	5		CTG	0	ALA		
							GCT	14
THR			TYR				GCC	10
	ACT	4		TAT	5		GCA	11
	ACC	10		TAC	9		GCG	1
	ACA	4						
	ACG	2	PHE			CYS		
				TTT	6		TGT	3
SER				TTC	6		TGC	1
	TCT	11						
	TCC	4	LYS			VAL		
	TCA	3		AAA	10		GTT	11
	TCG	2		AAG	9		GTC	1
	AGT	2					GTA	0
	AGC	0	HIS				GTG	4
				CAT	4			
GLU				CAC	4	MET		
	GAA	16					ATG	6
	GAG	2	ARG					
				CGT	3	ILE		
GLN				CGC	0		ATT	3
	CAA	5		CGA	0		ATC	6
	CAG	2		CGG	0		ATA	1
				AGA	12			
				AGG	1			
PRO								
	CCT	10						
	CCC	1	TRP					
	CCA	11		TGG	6			
	CCG	0						

Tabelle 4 : Codongebrauch im Präkursorprotein von
Cytochrom c₁.

4.1.3 Ausdehnung der Sequenzarbeiten im 5'-Bereich

Cytochrom c_1 wird von Glukose, Sauerstoff und Ham reguliert wie auch andere mitochondriale Cytochrome. Eines dieser Proteine - Iso-1-Cytochrom c aus Hefe - enthält, wie in der Einleitung dargestellt, Sequenzen (UAS) im 5'-nicht-kodierenden Bereich, die zu dieser Regulation auf Transkriptionsebene notwendig sind (Guarente and Mason, 1983). Dazu homologe Sequenzen wurden auch bei anderen Hefegenen gefunden (Superoxid-Dismutase = SOD (Marres et al., 1985), Cytochrom b_2 (Guiard, 1985), Iso-2-Cytochrom c (Zitomer, pers.Mitteilung)). Es bestand deshalb die Möglichkeit, daß auch das Cytochrom c_1 -Gen solche UASs besitzt. Eine Suche nach derartigen Sequenzen in den 360 bp des 5'-nicht-kodierenden Bereichs war jedoch nicht erfolgreich. Nicht auszuschließen war aber, daß sich die gesuchten Sequenzen noch weiter 5'-seitig befinden; bei Iso-1-Cytochrom c liegen die UAS1- und UAS2-Sequenzen -295 und -345 vor dem Translationsstart (AUG-Codon). Um die Sequenzierung 5'-seitig weiter auszudehnen, wurden drei andere Plasmide mit dem Cytochrom c_1 -Gen, die von M.Suissa et al. (1984) mit der Methode der differentiellen Hybridisierung isoliert worden waren, näher analysiert. Die Plasmide stammen aus einer Genbank, bei deren Herstellung Sau 3A I partial ge-schnittene, genomische DNA des Hefestammes FL100 in den Vektor YEp24 (Chevallier et al., 1980) kloniert wurde. Eine Restriktionsanalyse ergab, daß alle drei Plasmide am 5'-Ende länger waren als der Klon YEp13-41 (Fig.11). Zwei der Plasmide zeigen allerdings im Fragmentanteil Abweichungen vom YEp13-41 Restriktionsmuster. Im Fragment 204 liegt die Bam HI Stelle um ca.250 bp weiter von der proximalen HindIII Stelle entfernt; im Fragment 197 fehlte jegliche BamHI Stelle.



Figur 11 : Vergleichende Restriktionskarte der Cytochrom c_1 -Gen-tragenden Fragmente 113a, 197, 204 und 41. Die dicke Linie im Fragment 41 bezeichnet die Lage des proteinkodierenden Teils des Gens.

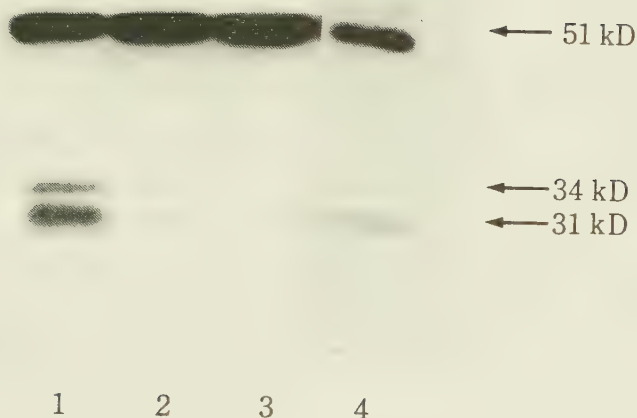
Dieser Befund kam nicht ganz unerwartet, da die Erfahrung mit Sau 3A I Genbanken gezeigt hat, daß oft verschiedene, im Genom nicht colineare Stücke im Vektor zusammen kloniert wurden.

Um eine mögliche Fehlklonierung auszuschließen, wurde getestet, ob die zwei abweichenden Plasmide ein funktionelles Cytochrom c_1 -Gen tragen, d.h. in Hefe exprimiert werden können. Dazu wurden die Plasmide in die Mutante 1165/101 (ura^- -Phänotyp), die kein immunologisch nachweisbares Cytochrom c_1 besitzt, transformiert.

Dabei ergab sich folgendes Bild: Alle 3 Plasmide können die Mutante komplementieren. Auffällig war, daß YEp24-197 keine so gute Komplementation zeigt wie die beiden anderen Plasmide. Nur 25% der LEU^+ -Transformanten waren gleichzeitig PET^+ .

Um die Menge an exprimiertem Cytochrom c_1 zu bestimmen, wurde je eine Transformante isoliert. Aus diesen wurden dann Zellextrakte hergestellt, mit denen ein Western-Blot mit Cytochrom c_1 -Antikörpern durchgeführt wurde (Fig.12).

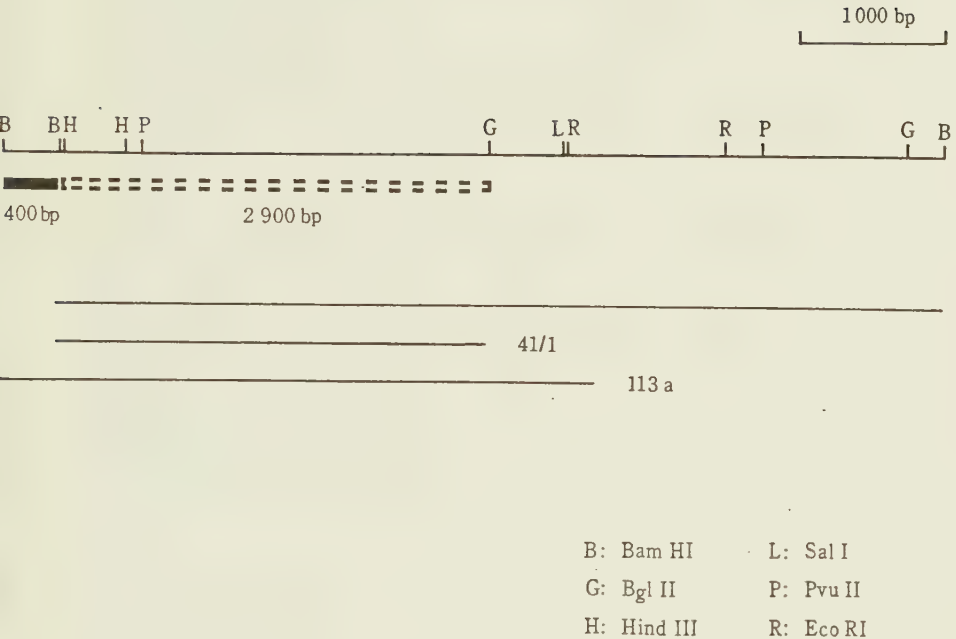
Alle 3 Transformanten enthalten ein immunologisch nachweisbares Cytochrom c_1 -Produkt. Mit Plasmid YEp24-197 und YEp24-204 transformierte Stämme (T197 und T204) zeigen nur eine schwache Bande (M-Form), die Transformante mit YEp24-113a (T113a) überexprimiert Cytochrom c_1 und weist zwei immunreaktive Banden auf (M- und I-Form). Das Auftreten der I-Form dürfte darauf zurückzuführen sein, daß bei Überproduktion des Präkursorproteins in der Zelle die Prozessierung geschwindigkeitbestimmend wird und nicht mehr genügend I-Form in die reife Form umgewandelt wird (siehe auch Fig.5, Spur 3 = YEp13-41 transformiert in 1165/11). Da ausschließlich bei T113a eine Überproduktion an Cytochrom c_1 -Protein auftritt, wurde angenommen, daß nur beim Fragment 113a der Promoterbereich intakt ist.



Figur 12 : In vivo Expression von Cytochrom c₁ nach Trans -
formation mit den Plasmiden YEp24-113a, -197, -204.
Die Mutante 1165/101 wurde mit den drei Cytochrom c₁- Plas -
miden YEp24-113a, -197, -204 transformiert. Zellextrakte aus je
einer Transformante wurden elektrophoretisch aufgetrennt und
einer Western-Blot-Analyse mit Cytochrom c₁-Antiserum unter -
zogen.
51 kDa = Hexokinase, 34 kDa = I-Form von Cytochrom c₁, 31 kDa
= M-Form von Cytochrom c₁
Spur 1: T 113a
Spur 2: T 197
Spur 3: T 204
Spur 4: wt

Um festzustellen, ob dieses Fragment auch auf Sequenzebene mit dem Fragment 41 am bereits bekannten 5'-Ende übereinstimmt, wurde das zu Fragment 41 homologe Hind III Stück, das von bp 17-bp 458 reicht, aus dem Plasmid YEp24-113a isoliert. Anschließend wurde es in den M13-Phagen mp8 kloniert, sequenziert und mit der Sequenz von 41 verglichen. Beide Sequenzen sind identisch. Das Plasmid YEp24-113a erschien deshalb geeignet, neue DNA-Sequenzen zu liefern, die 5'-seitig der bisher bekannten Sequenz liegen. Vor Beginn der Sequenzarbeiten war aber noch der Nachweis zu erbringen, daß die im Plasmid YEp24-113a vorhandene 5'-seitige Extension (ca. 400 bp) auch kolinear zu den chromosomalen Sequenzen ist; wie oben erwähnt besteht bei der Herstellung von Genbanken grundsätzlich die Möglichkeit der Rearrangierung von in vivo nicht benachbarten DNA-Fragmenten.

Aus den beiden Stämmen FL100 und D273/10B wurde Gesamt-DNA isoliert. Bei den folgenden Southern-Experimenten wurde immer DNA beider Stämme eingesetzt, da die zwei Genbanken, aus denen die Cytochrom c_1 -Plasmide stammen, mit DNA aus FL100 (Plasmid YEp24-113a) bzw. D273/10B (Plasmid YEp13-41) konstruiert worden waren. Diese Vorsichtsmaßnahme erschien gerechtfertigt, da bei verschiedenen Hefestämmen schon Unterschiede in den Restriktionsmustern gleicher Gene beobachtet wurden (Mortimer, persönliche Mitteilung). Die DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Bgl II, Hind III, Pvu II, Eco RI) und nach der Elektrophorese zweier identischer Ansätze auf Nitrozellulosefilter geblottet. Gegen diese Filter wurde nick-translatierte DNA hybridisiert: einmal wurde das 2900 bp Fragment 41/1 (in Plasmid YEp13-41 und YEp24-113a enthalten) benutzt und zum anderen das 400 bp Bam HI Fragment (nur im Plasmid YEp24-113a enthalten) (Strategie siehe Fig.13).



Figur13 : Strategie der Kolinearitätsanalyse. Die beiden Fragmente, mit denen die Hybridisierungen durchgeführt wurden, sind durch einen schwarzen Balken (400 bp) bzw. durch einen gestrichelten Balken (2900 bp) gekennzeichnet. Die obere Karte zeigt die postulierte genomische Sequenz, die aus den Restriktionsdaten der Fragmente 41 und 113a gewonnen wurde. Darunter sind maßstabsgerecht die Längen und Positionen der Fragmente 41 und 113a dargestellt.
(Siehe auch Fig.5 und 11)

Bei vorliegen einer Kolinearität mußte Hybridisierung gegen folgende Fragmente stattfinden:

<u>Fragment</u>	<u>Bgl II</u>	<u>Pvu II</u>	<u>Hind III</u>	<u>Eco RI</u>
2900 bp:	2900+a	4000,560+b	440,5600+c,(16+d)	3500+e
400 bp:	2900+a	560+b	16+d	3500+e

Die Buchstaben a, b, c, d, e bedeuten die (unbekannte) Länge der Extension der Restriktionsfragmente rechts und links über den kartierten Bereich hinaus.

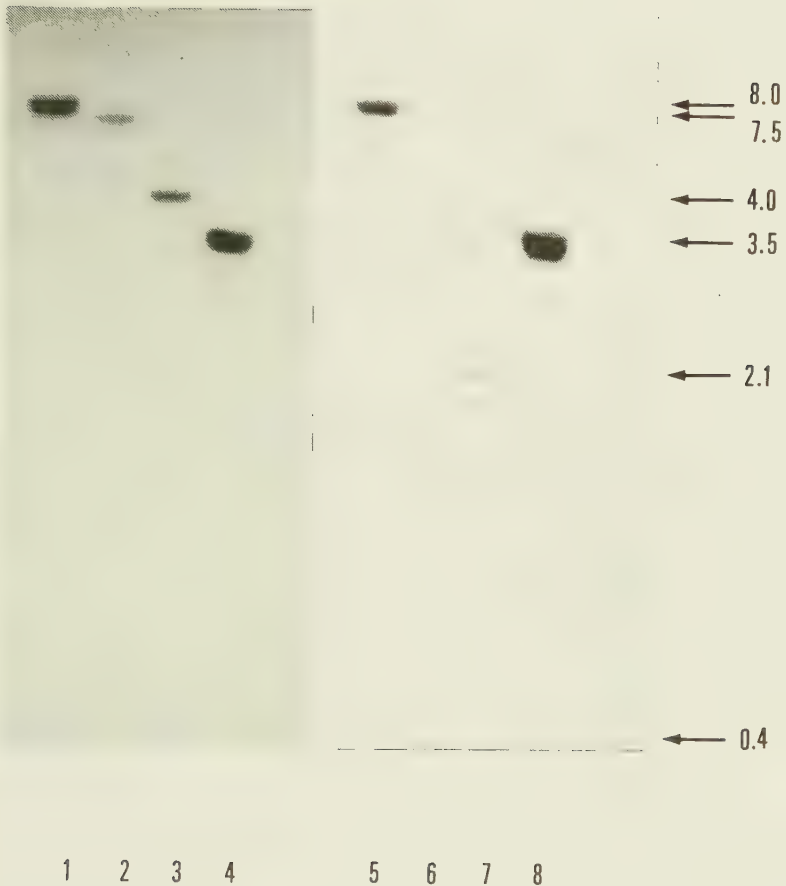
Die Fragmente, die wegen der sehr schwachen Hybridisierung auf dem Autoradiogramm (Fig.14) nicht sichtbar sind, sind in Klammern gesetzt.

Drei der Verdaus zeigen das erwartete Ergebnis, d.h. nur solche Banden erscheinen, die nach der theoretischen Überlegung auch in Betracht kommen. Da keine klare Aussage aus dem Ergebnis des Hind III Verdaus gezogen werden konnte (zwei der Banden (5600+c und 16+d), die hybridisieren sollen, wären gleich groß), wurde zusätzlich ein Hind III - Pvu II Doppelverdau durchgeführt und wiederum mit den beiden oben erwähnten Proben hybridisiert. Zu erwarten waren folgende Banden:

<u>Fragment</u>	<u>Hind III</u>	<u>Pvu I</u>	<u>Hind III/Pvu II</u>
2900 bp:	440,5600+c,16+d	4000,560+b	440,4000,(100,(16+d)-b)
400 bp:	16+d	560+b	(560+b) - 540

In Fig.15 zeigt sich genau das erwartete Bild. Damit war der endgültige Beweis erbracht, daß das 400 bp-Fragment auf dem Chromosom linear an das 2900 bp-Fragment anschließt.

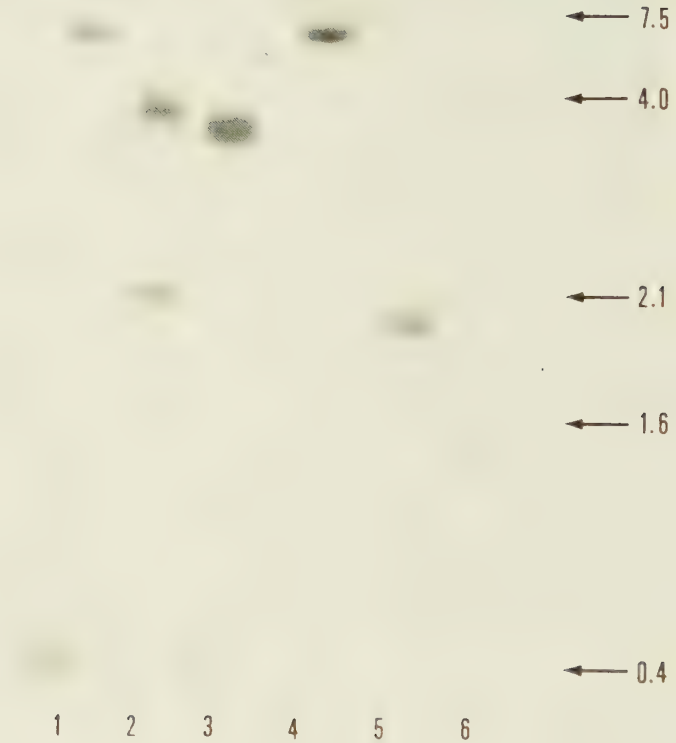
Darüberhinaus ergab sich, daß Hybridisierungen mit der DNA aus den beiden Stämmen FL100 und D273/10B zu identischen Ergebnissen führen, d.h. bei allen untersuchten Enzymen liegt kein Polymorphismus der Restriktionsstellen vor (nicht gezeigt).



Figur 14 : Bestimmung der Kolinearität des 0.4 kb Fragments durch genomische Southern-Analyse: Einzelverdaus
Spur 1-4: Hybridisierung gegen das 2900 bp Fragment. Spur 5-8: Hybridisierung gegen das 400 bp Fragment. In den einzelnen Spuren sind folgende Restriktionsverdaus aufgetragen:

Spur 1+5: Eco RI
Spur 2+6: Hind III
Spur 3+7: Pvu II
Spur 4+8: Bgl II.

Die Zahlen geben die Größe der Banden in kb an.



Figur 15 : Bestimmung der Kolinearität des 0.4 kb Fragments durch genomische Southern-Analyse: Einzel- und Doppelverdaus

Spur 1-3: Hybridisierung gegen das 2900 bp Fragment, Spur 4-6: Hybridisierung gegen das 400 bp Fragment.

Spur 1+4: Hind III

Spur 2+5: Pvu II

Spur 3+6: Hind III + Pvu II

Die Zahlen geben die Größe der Banden in kb an.

4.5.4 Sequenzanalyse

Mit der in 3.8 beschriebenen Methode wurde das 400 bp Fragment sequenziert. Die DNA-Sequenz ist in Fig.16 dargestellt. Durch Computeranalyse konnten zwei Sequenzen bestimmt werden, die über 50% Homologie zu UAS1 von Iso-1-Cytochrom c besitzen. Über die funktionelle Bedeutung der Sequenzen kann aber derzeit noch nichts ausgesagt werden, Untersuchungen dazu sind in den Gruppen Haid und Bandlow in Gang.

4.6 Bestimmung der Zahl der Genkopien im Hefegenom

Cytochrom c, ein anderes Hämprotein der Atmungskette, kommt wie bereits erwähnt in Hefe in zwei isoenzymatischen Formen vor. Im Normalfall (aerob, dereprimiert) werden 95% des Gesamt-Cytochroms als Iso-1-Cytochrom c und nur 5% als Iso-2-Cytochrom c synthetisiert. Beide Isoenzyme werden von unterschiedlichen Genen (CYC1 bzw. CYC7) kodiert. Die Cytochrome sind aber funktionell identisch und besitzen auf DNA Ebene 76% Homologie (Montgomery et al., 1980).

Mit dem Cytochrom c_1 -Plasmid war es nun möglich, durch Hybridisierungsexperimente zu prüfen, ob in der Zelle nur eine Kopie des Gens vorliegt oder ob - ähnlich wie bei Cytochrom c - mehrere homologe Formen auftreten.

Chromosomale DNA des Stammes D273/10B wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter geblottet. Dieser wurde gegen das Fragment 41 bei geringer Stringenz hybridisiert (d.h. Hybridisierung bei einer Temperatur von maximal 60°C, Waschschritte bei einer Temperatur unter 60°C, um auch eine Hybridisierung gegen kurze Fragmente zu erhalten).

```

5'      10      20      30      40      50      60      70      80
GGATCCAAAGTGCTAAGGAACTGTACCTGATATCCGAATCCGAGTTTTCTTGGCGAGGTGTTCATTGCTGTAGAC
CCTAGGTTTCACGATTCTCTTTGACATGGACTATAGGCTTAGGCTCAAAAGCAACCGCTCGACAAGGTAACGACATCTG

      90      100      110      120      130      140      150      160
AAAAAACTTCCTTGTAAGCGGATGTGCTAGCGCATCATACATTTTCAGTTCTATTAAGACTTTTCACAGATGCTGTTGT
TTTTTTGAAGGAACATTTTCGCTACACGATCGCGTAGTATGTAAAGTCAAGATAATTCTGAAAGTCTCTACGACAACA

      170      180      190      200      210      220      230      240
TGTTCTGTGAGCCAATCCCAAATGTTTGTATAAGGACGGAAATAAGACGAGCGGACGTGACTGAAGATTTTTTTTTT
ACAAGACACTCGGTTAGGGTTTACAAACATATTCCTGCCTTTATTCTGCCTCGCGGTGACTGACTTCTAAAAAAAAC

      250      260      270      280      290      300      310      320
CGGATTTCCTGGTAATGGCGCGCGCGGTATTTCCGGCGCGCAAAAAATGCGAGGATTTGTTTGGTGGAGAGGGTCGAGC
GCCTAAAGAACCATTACCCGCGCGGCATAAAGGCGCGCGGTTTTTTACGGCTCTTAAACCAACCACCTCTCCACAGCTCG

      330      340      350      360      370      380      390      400
CTTTACCCTGCGTAGATACTAAGGGGGCTCTTTCTAGTATATAAAACAATTTGAATAATAACGAGGTTAGACGTCCAAC
GAAATGGGACGCATCTATGATTCCCCGAGAAAGATCATATATTTGTTAAACTTATTATTGCTCCAATCTGCAGGTTG

      410      420      430      440      450      460      470      480
GATCC
CTAGG
3'

```

Bam HI = GGATCC

Figur 16 : Ausdehnung der DNA-Sequenz über die 5'-Bam HI Stelle des Fragments 41 hinaus.
Die Sequenz ist in 5'-3'-Richtung dargestellt, der Anschluß an das Fragment 41 erfolgt über die 3'-Bam HI Restriktionsstelle.

Anhand der bekannten Restriktionskarte war die Zahl und die Mindestgröße der Fragmente vorherzusagen, die im Falle einer einzigen Kopie positive Signale produzieren:

Pvu II: 3 Banden: 0.56 kb + x, 4 kb, 1.2 kb + x
Hind III: 3 Banden: (0.016 kb + x), 0.44 kb, 5.6 kb + x
Pst I: 1 Bande : x
Sal I: 2 Banden: 3.5 kb + x, 2.5 kb + x
Bgl II: 3 Banden: 0.4 kb + x, 2.9 kb + x, 2.7 kb
Bam HI: 1 Bande : 6 kb

x: unbekannte Extension des Fragments über den kartierten Bereich hinaus

Auf dem Autoradiogramm in Fig.17 kann man erkennen, daß nur die erwarteten und keine zusätzlichen Banden auftreten. Das Cytochrom c_1 -Gen liegt also nur in einer Kopie im Chromosom vor.



Figur 17 : Genomische Southernanalyse zur Bestimmung der Cytochrom c_1 -Kopien im Chromosom.
DNA des Hefe-Wildtyp-Stammes D272/10b wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter seblottet und gegen Fragment 41 hybridisiert.

- Spur 1: Bam HI, 6 kb
- Spur 2: Bgl II, 4.8 kb, 3.4 kb, 2.7 kb
- Spur 3: Pvu II, 4.5 kb, 4 kb, 1.8 kb
- Spur 4: Pst I, 9 kb
- Spur 5: Sal I, 5 kb, 4.5 kb
- Spur 6: Hind III, 7.5 kb, 0.4 kb

4.7 Analyse des Cytochrom c₁-Transkripts

Das Cytochrom c₁-Transkript wurde untersucht, um über folgende Punkte Aufschluß zu gewinnen:

- a) Da bei verschiedenen Hefegenen beobachtet wurde, daß mehrere Initiationsstellen der Transkription vorliegen (z.B. bei Iso-1-Cytochrom c sieben, Faye et al., 1981), sollte durch eine Northern-Blot-Analyse überprüft werden, ob bei Cytochrom c₁ nur eine oder mehrere Banden auftreten. Gleichzeitig könnte dadurch die Größe des Transkripts bestimmt werden.
- b) Für den Start und den Stop der Transkription eines Gens wurden verschiedene Consensus-Sequenzen identifiziert. Auch in den nicht-kodierenden Regionen des Cytochrom c₁-Gens wurden einige dazu homologe Sequenzen gefunden (siehe Diskussion). Einen Hinweis darauf, ob diese Sequenzen funktionell sind oder nicht, könnte eine Bestimmung des Start- und Endpunkts der mRNA geben und die Lage der Consensus-Bereiche in Bezug auf diese Stellen.

4.7.1 Größenbestimmung

Zur Größenbestimmung des Cytochrom c₁-Transkripts wurde aus dem Wildtyp-Stamm D273/10B Gesamt-RNA isoliert. Ein Aliquot dieser RNA wurde glyoxyliert und ein doppelter Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die Hälfte des Gels mit EB angefärbt und zur Größenbestimmung des Markers fotografiert. Der andere Teil wird auf einen Nitrozellulosefilter geblottet und gegen eine radioaktive Cytochrom c₁-Probe hybridisiert. Auf dem Autoradiogramm erscheint nur eine einzige Bande, deren Größe mit ca. 1200 b bestimmt wird (Fig.18).

4.7.2 Endenbestimmung durch S1-Kartierung

Im 5'-nicht-kodierenden Bereich wurde durch S1-Mapping mit der

Maxam-Gilbert Methode der Start der Transkription bestimmt. Es wurde ein Hind III-Hinf I Fragment (Position 145-458) der Länge 313 bp isoliert, von dem angenommen wurde, daß es den Start der mRNA enthält. Das Fragment wurde an den 5'-überstehenden Enden mit radioaktivem $^{32}\text{P}\alpha$ -ATP markiert, die Einzelstränge in einem Strangtrennungsgel (Maxam and Gilbert, 1980) voneinander getrennt und jeweils die Hälfte der zwei Einzelstrang-DNAs gegen Gesamt-Hefe-RNA (auf Laktatmedium gezogen) des Hefestammes D273/10B hybridisiert und einer S1-Nuklease-Behandlung unterzogen. Danach wurde die RNA wieder von der DNA getrennt. Die nicht mit S1-Nuklease behandelten Einzelstränge wurden ebenfalls sequenziert. Beide Sequenzierungsansätze wurden neben den S1-behandelten Einzelsträngen auf einem denaturierenden Sequenzgel aufgetragen und elektrophoretisiert. Das Autoradiogramm zeigt in einer S1-Spur eine Bande bei der Sequenz CCAGTACACCCCC zwischen den ersten zwei C und den fünf C (nicht gezeigt). Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß nur eine Initiationsstelle vorliegt.

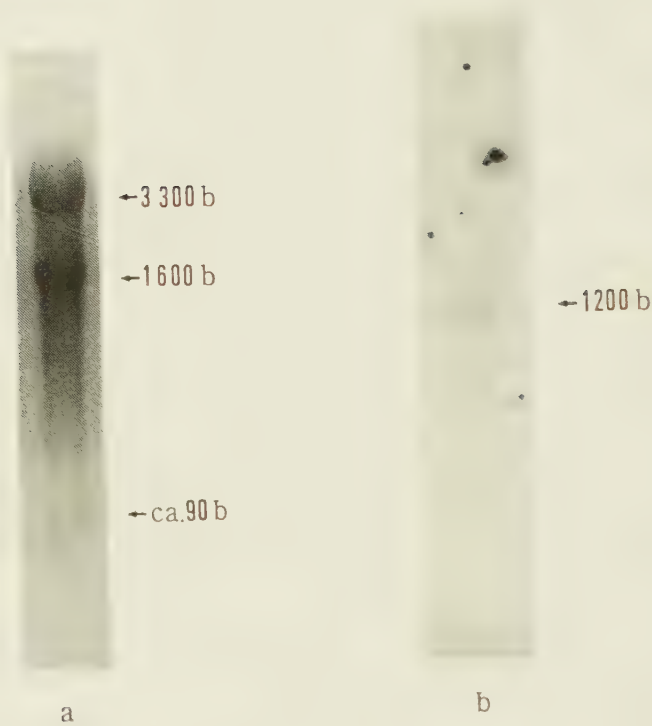
Um das 3'-Ende des Transkripts zu bestimmen, wurde ein Fragment isoliert, das die Consensus-Sequenzen für den Transkriptionsstop und die Polyadenylierung (siehe Diskussion) enthält. Dafür stand nur ein 249 bp Hae III Fragment zur Verfügung (Position 1243 - 1492). Dieses wurde an den 3'-Enden mit Cordycepin (Tu and Cohen, 1980) markiert und der Doppelstrang getrennt. Dann wurde wie beim 5'-Ende weiter verfahren. Auch nach sehr langer Exposition des Gels (über 4 Wochen) konnte selbst nach Wiederholung des Experiments kein S1-Signal gefunden werden.

Da bekannt war, daß Cordycepin-Markierungen wie auch andere 3'-Markierungen oft sehr ineffektiv verlaufen, wurde versucht, das Ziel mit einer anderen Methodik zu erreichen.

Eine Cytochrom c_1 -Mutante (1165/102, trp^-) wurde mit einer Hefe-cDNA-Genbank (Mc Knight and Mc Conough, 1983) transformiert und nach komplementierenden Plasmiden, d.h. nach Plasmiden mit intaktem Cytochrom c_1 -Gen gesucht. Bei der Konstruktion einer cDNA-Genbank wird mRNA isoliert und die dazu synthetisierte, komplementäre DNA kloniert. Die Fragmentenden eines die Mutante komplementierenden Plasmids müßten also den Enden der Cytochrom c_1 -mRNA entsprechen.

Nach Transformation konnte kein komplementierendes Plasmid isoliert werden; Grund dafür könnte sein, daß die cDNA-Genbank mit mRNA aus in Glukosemedium gewachsenen Zellen konstruiert worden war und wegen der Katabolitrepression (siehe Einleitung) der Anteil der Cytochrom c_1 -mRNA an der Gesamt-RNA zu gering war, um einen positiven Cytochrom c_1 -cDNA-Klon zu liefern. Auch eine Koloniehybridisierung der cDNA-Klone gegen eine Cytochrom c_1 -Probe verlief negativ (nicht gezeigt), was ebenfalls für diesen Grund spricht.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann man also die Schlüsse ziehen, daß erstens die Cytochrom c_1 -mRNA ca. 1200 b groß ist, zweitens das 5'-Ende dieser mRNA ca 170 bp vor dem Translationsstart (ATG) liegt und drittens das 3'-Ende der mRNA dann ca. 100 bp vom Translationsstop (TAG) entfernt sein muß. Außerdem wurde gezeigt, daß bei Cytochrom c_1 im Gegensatz zu Iso-1-Cytochrom c nur ein Startpunkt der Initiation vorhanden ist.



Figur 18 : Northern-Blot zur Bestimmung der Transkriptgröße. Gesamt-RNA aus dem Wildtyp-Hefestamm D/73/10B wird elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Der Filter wird gegen eine Cytochrom c_1 -Probe hybridisiert.
a) Aufgetrennte Gesamt-RNA nach EB-Färbung: 3300 b = große rRNA; 1600 b = kleine rRNA; 70-90 b = tRNA
b) Northernhybridisierung

4.8 Expression des Plasmid-gebundenen Cytochroms c₁-Gens in Hefe

Die Analyse von Hefetransformanten, die verschiedene Cytochrom c₁-Plasmide enthalten (YEp13-41 mit 6000 bp Fragment; YEp13-41/1 mit 2900 bp Fragment; YEp24-113a mit 4000 bp Fragment), ergab im Verlauf der Arbeit einen hervorzuhebenden Befund. Lange Fragmente wie bei 41 und 113a führten offensichtlich zu einer höheren Cytochrom c₁-Produktion als kurze Fragmente. Im folgenden werden summarisch die bisher erzielten Einzelergebnisse dargestellt.

Fragment	Länge	Überproduktion	Orientierung des Gens in Bezug auf Tet-Promoter
41	6 kb	+++++	➡
41/1	2.9 kb	++	➡
113a	4 kb	+++++	➡

Als Ursache für die unterschiedliche Überexpression können folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

- Die Plasmide kommen in unterschiedlicher Kopienzahl in der Hefezelle vor, was einen unterschiedlichen Gen-Dosis-Effekt bewirkt.
- Die Transkription der Gene wird je nach Orientierung der Fragmente im Plasmid durch Plasmidsequenzen positiv oder negativ beeinflusst.
- Die längeren Fragmente besitzen zusätzliche Sequenzen, welche die Transkriptionsrate erhöhen.

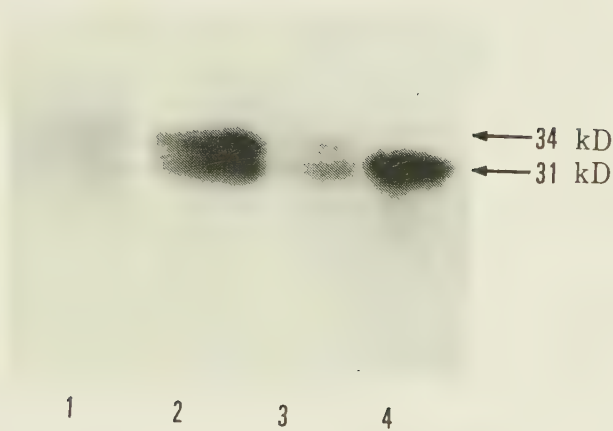
Es fällt auf, daß sowohl YEp13-41 als auch YEp24-113a Cytochrom c₁ überproduzieren, obwohl bei YEp13-41 5'-seitig das 400 bp

Bam HI Fragment fehlt. Beide Plasmide besitzen aber gleiche DNA-Sequenzen 3'-seitig vom Gen, die beim Plasmid YEp13-41/1 (geringe Überproduktion) fehlen. Im folgenden wurden die Fragmente 41 und 41/1 miteinander verglichen und untersucht, ob der oben unter c) beschriebene Fall vorliegt. Da bisher bei Hefe keine 3'-seitigen Regulationssequenzen bekannt sind, kam dieser Analyse besondere Bedeutung zu.

Fig.19 zeigt nochmals zusammengefaßt die Befunde der Überexpression von YEp13-41 im Vergleich zu YEp13-41/1.

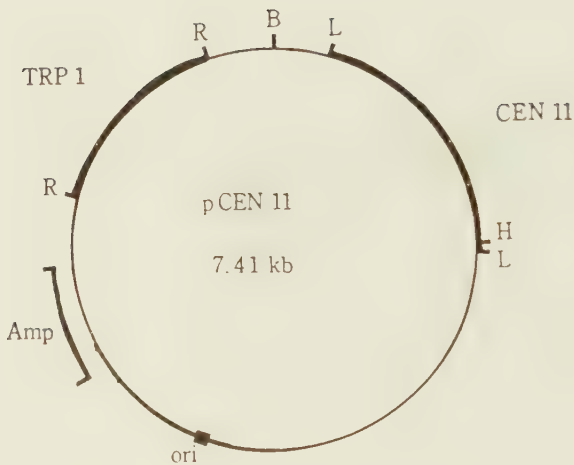
Um die oben unter a) und b) beschriebenen möglichen Ursachen der Überproduktion - nämlich die Kopienzahl des Plasmids und die Orientierung des Fragments im Plasmid - auszuschalten und um c) zu prüfen, wurden die zwei Fragmente in den beiden möglichen Orientierungen vom Plasmid YEp13 in ein Centromer-tragendes E.coli -Hefe-Plasmid (pCEN11, Fig.20) umkloniert. pCEN-Plasmide besitzen - zusätzlich zu autonom replizierenden Plasmiden - ein Fragment, das die Centromerregion eines Hefechromosoms enthält. Das hat zur Folge, daß sich das Plasmid in Hefe wie ein Minichromosom verhält und es im Mittel nur eine Kopie pro Zelle gibt.

Das Cytochrom c_1 -Gen liegt also nach Transformation mit einem pCEN-Plasmid in zwei Kopien pro Zelle vor (eine Kopie auf dem Plasmid, eine im Chromosom). Da die Expression der chromosomalen Kopie in der Mutante 1165/102 unterdrückt ist (siehe Fig.1), kann man die Mengen der von den pCEN-Plasmiden exprimierten Proteine direkt miteinander vergleichen.



Figur 19 : Vergleich der Cytochrom c₁-Expression von Mutantenstämmen nach Transformation mit den Plasmiden YEpl3-41 und YEpl3-41/1. Von Zellextrakten der Transformanten, der Mutante und des Wildtyp-Stammes wurden je 50 µg Protein pro Spur elektro - phoretisiert und mit dem Gel eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

Spur 1: Mutante 2006/2
Spur 2: 2006/2 transformiert mit YEpl3-41
Spur 3: 2006/2 transformiert mit YEpl3-41/1
Spur 4: wt



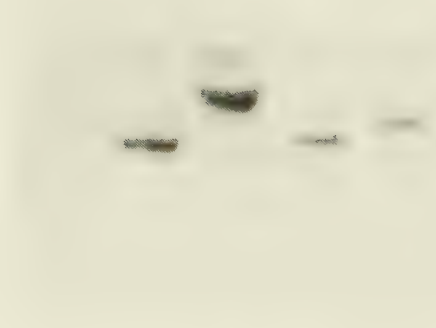
Figur 20 : Restriktionskarte des Hefe- *E.coli* -Plasmids pCEN11. Die dicken Linien bezeichnen das selektierbare TRP1-Hefegen sowie die Centromerregion des Chromosoms XI. Die restlichen Teile (dünne Linie) stellen die vollständige pBR322 Sequenz dar.

B: Bam HI
L: Sal I
H: Hind III
R: Eco RI

Die resultierenden 4 pCEN-Plasmide (pCEN11-41 $\rightarrow$, pCEN11-41 $\leftarrow$, pCEN11-41/1 $\rightarrow$, pCEN11-41/1 $\leftarrow$) wurden in die Mutante 1165/102 transformiert, je eine Transformante, mit TRP⁺-, PET⁺- Phänotyp, isoliert und durch mitotische Segregation das Auftreten von Revertanten ausgeschlossen (das benutzte pCEN11-Plasmid ist mitotisch instabil; Oertl et al., 1984).

Nachdem die genetischen Tests positiv verlaufen waren, wurde geprüft, ob das pCEN-Plasmid in den vier Transformanten in gleicher Kopienzahl vorliegt. Dazu wurde Gesamt-DNA isoliert, mit Pvu II geschnitten, auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter geblottet. Mit einem radioaktiven, das TRP1-Gen-tragenden Fragment wurde eine Hybridisierung durchgeführt. Die gleiche Intensität der TRP-Banden in den vier Spuren deutet darauf hin, daß in allen Transformanten das jeweilige pCEN Plasmid mit gleicher Häufigkeit auftritt. Ein direkter Vergleich mit dem genomischen TRP-Fragment (obere Banden) war nicht durchzuführen, da die benutzte Gesamt-DNA-Präparation offensichtlich eine Bevorzugung von Plasmid-DNA ergibt (Fig.21).

Danach wurden von jeder Transformante Zellextrakte hergestellt. Diese wurden auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisiert und auf Nitrozellulose geblottet. Der Filter wurde sukzessive mit Antikörper gegen Cytochrom c₁ und jodiniertem Protein A inkubiert und autoradiographiert. Zur Standardisierung der Proteinmenge wurde am gleichen Filter die ganze Prozedur noch mit einem gegen ein nicht-mitochondriales Protein gerichteten Antikörper (Anti-Hexokinase) wiederholt (Fig.22).



1 2 3 4 5

Figur 21 : Vergleich der Kopienzahl von pCEN-Plasmiden in der Hefemutante 1165/102

Die Mutante 1165/102 wurde mit den vier konstruierten pCEN-Plasmiden transformiert. Aus je einer Transformante wurde Gesamt-DNA isoliert, mit Bgl II geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Dieser Filter wurde gegen ein TRP1-Fragment hybridisiert.

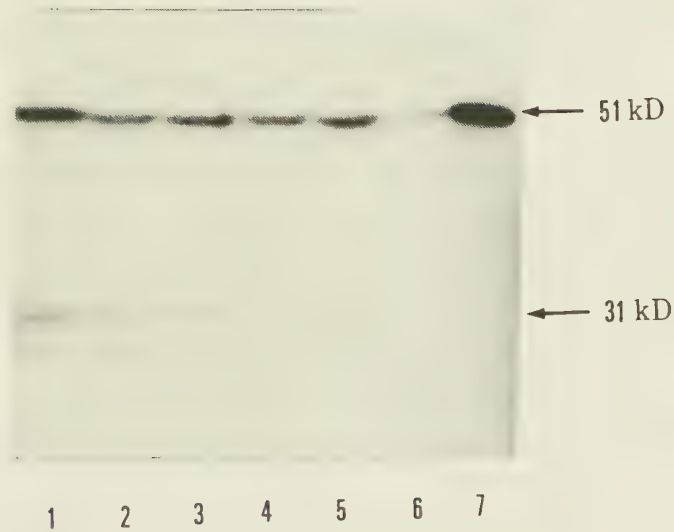
Spur 1: 1165/102 untransformiert

Spur 2: 1165/102 transformiert mit pCEN11-41→

Spur 3: 1165/102 transformiert mit pCEN11-41←

Spur 4: 1165/102 transformiert mit pCEN11-41/1→

Spur 5: 1165/102 transformiert mit pCEN11-41/1←



Figur 22 : Cytochrom c_1 -Expression in pCEN-Hefe - transformanten.

Zur Bestimmung der Cytochrom c_1 -Proteinmenge in den vier beschriebenen pCEN-Transformanten wurden aus diesen Zellextrakte hergestellt und damit eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Zur Standardisierung wurde der Filter zusätzlich zum Cytochrom c_1 - Antiserum noch mit Hexokinase-Antiserum behandelt.

Spur 1:	wt
Spur 2:	1165/102 transformiert mit pCEN11-41→
Spur 3:	1165/102 transformiert mit pCEN11-41←
Spur 4:	1165/102 transformiert mit pCEN11-41/1→
Spur 5:	1165/102 transformiert mit pCEN11-41/1←
Spur 6:	1165/102
Spur 7:	1165/11

Die Intensität der Banden auf dem Autoradiogramm wurde im Laser - densitometer (LKB) gemessen und mit dem Wildtyp verglichen. Alle vier Transformanten zeigen ungefähr die gleiche Cytochrom c_1 -Proteinmenge (standardisierte Cytochrom c_1 -Proteinmenge = Verhältnisswerte, die aus den vom Densitometer wieder - gegebenen Kurven berechnet wurden: 0.8, 0.7, 0.95, 0.85).

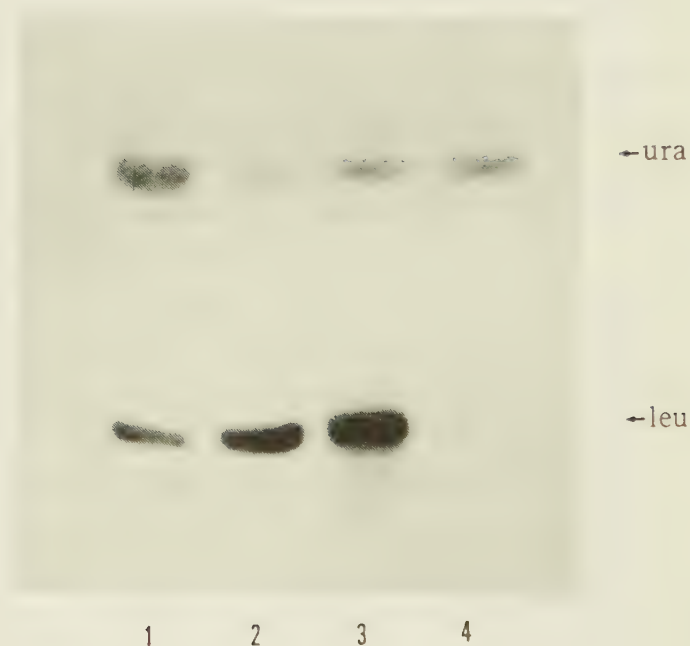
Dieses Ergebnis erlaubt folgende Schlüsse: 1. die beim autonomen YEp13-Plasmid beobachteten Überproduktionseffekte sind nicht auf 3'-seitige, cis-wirkende Regulationssequenzen zurückzuführen, die beim Fragment 41/1 fehlen, und 2. die Orientierung des Fragments im Plasmid beeinflußt die Expression nicht.

Das Fragment 113a entspricht 3'-seitig in etwa dem Fragment 41. Es war deshalb zu erwarten, daß sich auch hier nach Klonieren in pCEN die gleichen Resultate ergeben wurden; von einer weiteren Untersuchung wurde deshalb abgesehen.

Nachdem die Möglichkeiten b) und c) verworfen werden konnten, wurde a) untersucht. Dazu wurde die Kopienzahl der "multi copy"-Plasmide YEp13-41 und YEp13-41/1 in Hefetransformanten selbst bestimmt. Aus je einer Transformante wurde DNA isoliert. Die DNA wurde mit Bgl II geschnitten und auf einen Nitro - zellulosefilter geblottet. Mit diesem Filter wurde eine Hybridisierung gegen ein LEU2-Fragment und ein Fragment, auf dem das URA3-Gen lokalisiert ist, durchgeführt. Das LEU2-Gen wurde durch einen Sal I - Xho I Schnitt als 2.1 kb Fragment aus dem Vektor YEp13 isoliert, das URA3-Gen durch einen Hind III Schnitt als 1.1 kb Fragment aus dem Vektor YEp24. Das LEU2-Fragment hybridisiert gegen ein ca. 1000 bp großes DNA-Fragment auf dem Filter, das durch den Bgl II Verdau aus den Plasmiden, die zusammen mit der Gesamt-DNA isoliert wurden, herausgeschnitten wurde. Je mehr Plasmid in der transformierten Zelle enthalten ist, umso dunkler

wird die Bande. Als Kontrolle für die Menge der eingesetzten DNA dient die Hybridisierung gegen das URA3-Fragment. Da die Plasmide YEp13-41, YEp13-41/1 und YEp13 kein URA3-Gen besitzen, findet eine Hybridisierung nur gegen das URA3-Gen aus der chromosomalen DNA statt, das im haploiden Genom in nur einer Kopie vorliegt. Durch einen Vergleich der Intensität der beiden Banden, (URA3 gegen LEU2), läßt sich die Kopienzahl schätzen: YEp13: 50 Kopien/Zelle; YEp13-41: 87 Kopien/Zelle; YEp13-41/1: 18 Kopien/Zelle (Fig.23).

Der Klon YEp13-41/1 liegt in geringerer Kopienzahl vor als der Klon YEp13-41. Das ist erstaunlich, da man erwarten würde, daß Plasmide mit kleinerem Insert sich schneller replizieren als Plasmide mit großem Insert und deshalb mehr Kopien pro Zelle bilden. Als Erklärung für die große Kopienzahl beim langen 41 Fragment, könnte postuliert werden, daß zusätzliche Sequenzen vorhanden sind, welche eine höhere Replikation bewerkstelligen. Eine Möglichkeit wäre das Auftreten eines zusätzlichen Replikationsorigins. In Hefe sind verschiedene ars-Sequenzen identifiziert und auch schon kloniert worden. Obwohl in vivo erzielte Resultate noch ausstehen, nimmt man an, daß diese Sequenzen die chromosomalen Replikationsorigins darstellen. Sie kommen auf dem Chromosom durchschnittlich alle 40 kb vor.



Figur 23 : Bestimmung der Kopienzahl der Plasmide YEp13-41, YEp13-41/1 und YEp13.

DNA, die aus den entsprechenden Hefetransformanten isoliert wurde, wurde mit Bgl II geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Der Filter wurde gegen ein URA3-Fragment (interner Standard) und ein LEU2-Fragment hybridisiert.

Spur 1:	Hefetransformante	mit YEp13-41/1
Spur 2:	"	mit YEp13-41
Spur 3:	"	mit YEp13
Spur 4:	wt	

Nachdem Hybridisierungsversuche mit einer *arsI*-Sequenz (aus dem Plasmid YRp7 (Tschumper and Carbon, 1980)) zu negativen Resultaten führten (nicht gezeigt), wurde das Bgl II Fragment des Plasmids YEp13-41, das nicht das Cytochrom c_1 -Gen enthält und auch nicht in YEp13-41/1 enthalten ist, in den integrierenden Vektor YIp5 (Struhl et al., 1979) kloniert. Dieser Vektor enthält keinen Replikationsorigin und kann in Hefe nur nach Integration ins Chromosom propagiert werden. Die Idee des Versuchs war, zu prüfen, ob das Plasmid YIp5 nach Klonierung des Fragments zu einem autonom replizierenden Vektor umgewandelt werden kann. Das wäre ein Beweis für das Vorkommen einer *ars*-Sequenz auf dem Bgl II Fragment. Mit dem konstruierten Plasmid wurde der ura^- -Stamm DBY747 transformiert. Transformationen mit integrierenden Plasmiden ergeben nur wenige Transformanten, da der Vorgang der Integration ins Chromosom sehr selten stattfindet und das Plasmid selbst keinen Replikationsorigin besitzt. Wäre nun auf dem Fragment eine *ars*-Region vorhanden, müßte man im Vergleich zur Transformation mit YIp5 ohne Insert sehr viel mehr (ca. 100 mal) Transformanten erhalten, da *ars*-Regionen als Replikationsorigins des Hefechromosoms fungieren. Beide Transformationen, die mit der gleichen DNA-Menge YIp5 mit und ohne Fragment durchgeführt wurden, ergaben gleiche Transformantenzahlen.

Der vorliegende negative Befund schließt aber das Fehlen einer *ars*-Sequenz nicht vollständig aus. Diese könnte nämlich so um die Bgl II Stelle gelagert sein, daß sie bei der Klonierung des Bgl II Fragments zerstört wurde.

Bei diesem Stand wurden die Untersuchungen nicht mehr weitergeführt; sie hätten einen zu großen Aufwand an weiteren Klonierungen erfordert, der in Bezug auf die Analysen des Cytochrom c_1 -Gens nicht mehr rechtfertigen war.

4.9 Genkartierung

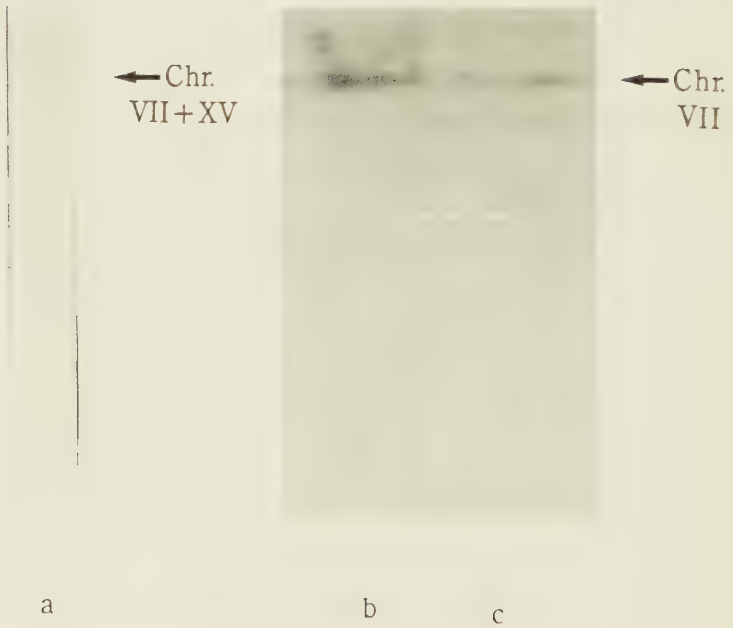
Die Kartierung eines klonierten Gens auf einem bestimmten Chromosom ist mit genetischen und Transformations-Methoden (Falco et al., 1982, 1983) möglich, aber relativ aufwendig. Mit Hilfe einer neuen Methode (OFAGE = Orthogonal field alternation gel electrophoresis) lassen sich ganze Chromosomen auf einem Gel auftrennen. Nach Hybridisierung des klonierten Fragments gegen die chromosomalen Banden, kann das Gen einfach einem Chromosom zugeordnet werden. Um intakte Chromosomen zu erhalten, muß die Hefe-DNA äußerst vorsichtig isoliert werden. Die Zellen werden zu diesem Zweck in "low-melting" Agarose eingebettet und in der Agarose mit Zymolyase aufgeschlossen. Eine Scheibe der in der Agarose eingebetteten lysierten Zellen wird in die Tasche eines Gels eingesetzt und elektrophoretisiert. An das Gel wird ein orthogonales elektrisches Feld angelegt, das in kurzen Zeit - abständen alternierend umgepolt wird. Das Gel kann nach der Southern-Methode auf Nitrozellulose geblottet werden. Mit dem Filter können Hybridisierungen mit Fragmenten, die das Gen von Interesse enthalten, durchgeführt werden.

Die Identifizierung der einzelnen Chromosomen wurde mit Hilfe klonierter Gene, von denen die Chromosomenlokalisierung schon bekannt war, vorgenommen.

Einige Chromosomen komigrieren auf dem Gel und erscheinen als eine Bande; man kann sie jedoch auftrennen, indem man Stämme benutzt, bei denen diese Chromosomen einen Längenpolymorphismus haben.

Ein Filter, bei dem Chromosomen des Stammes VB220A aufgetrennt waren, wurde von Daniel Jäger (Biozentrum Basel) zur Verfügung gestellt. Die Hybridisierung wurde mit einem 1600 bp (Bam HI /

Hpa I) Fragment, das das Cytochrom c_1 -Gen enthält, durch -
geführt. Es fand eine Hybridisierung gegen eine Doppelbande
statt, die Chromosom VII und XV repräsentiert. Deshalb wurde eine
weitere Hybridisierung durchgeführt, mit einem Stamm, der die
Chromosomen XV und VII auf trennt (DC04). Als Kontrolle für
Chromosom VII wurde als zweite Hybridisierungsprobe noch ein
Fragment mit der Centromersequenz des Chromosoms VII gewählt. Man
kann damit sehen, ob beide Fragmente an die gleiche Bande (VII)
oder an verschiedene Banden (VII und XV) hybridisieren. Da beide
Banden im Autoradiogramm nebeneinander liegen, konnte das
Cytochrom c_1 -Gen eindeutig dem Chromosom VII zugeordnet
werden (Fig.24).



Figur 24 : Genkartierung des Cytochrom c_1 -Gens
Ganze Chromosomen der Stämme VB220A und DC04 wurden elektro -
phoretisch aufgetrennt, auf einen Nitrozellulosefilter geblottet
und gegen Cytochrom c_1 -, bzw. CEN7-Fragment hybridisiert.
a) Hybridisierung der Chromosomen des Stammes VB220A gegen
Cytochrom c_1 -Fragment
b) Hybridisierung der Chromosomen des Stammes DC04 gegen
Cytochrom c_1 -Fragment und
c) CEN7-Fragment

5. Diskussion

Der weitaus größte Teil der genetischen Information, die zum Aufbau und zur Vermehrung funktionsfähiger Mitochondrien nötig ist, wird vom Kerngenom bereit gestellt. Um zu verstehen wie diese Information bei der Biogenese der Organellen verwertet wird, ist es nötig, die Struktur und die Expression der individuellen Gene zu kennen. Besondere Aufmerksamkeit fanden in den letzten Jahren jene Kerngene, die für mitochondriale Proteine der Zellatmung und Energiekonservierung kodieren. Mehrere Gründe haben zu diesem speziellen Interesse beigetragen:

1. Seit langem ist man bemüht, den komplexen Prozeß der Energie - konservierung im molekularen Detail zu erforschen. Leider haben sich die meisten daran beteiligten Proteine einer genauen Analyse entzogen. Dies lag hauptsächlich darin begründet, daß sie als Membranproteine innermitochondrialer Enzymkomplexe sehr schwer zu isolieren und wegen ihrer Hydrophobizität nur in Gegenwart von Detergentien in Lösung zu halten sind.

Auf dem Umweg über die Isolierung ihrer Gene erhoffte man deshalb, die benötigten Informationen über Aminosäurezusammensetzung und Primärsequenzen zu erhalten.

2. Einige multimere Enzymkomplexe der Energiekonservierung (Ubichinol-Cytochrom c Reduktase; Cytochrom c Oxidase; F1-ATPase) bestehen aus Untereinheiten unterschiedlicher genetischer Herkunft. So sind z.B. vier der sieben Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase kernkodiert, während die restlichen von der mitochondrialen DNA spezifiziert werden (Schatz and Mason, 1974; Ebner et al., 1973). Da die einzelnen Komplexe aus stöchiometrischen Mengen der einzelnen Untereinheiten zusammengesetzt sind, wird spekuliert, daß die Expression der für sie kodierenden Gene koordiniert ist, d.h. daß zwischen Kern und Mitochondrien Informationen regulatorischer Art ausgetauscht werden.

Voraussetzung zu gezielten Expressionsstudien waren deshalb die isolierten Gene mit intakten Signalsequenzen.

3. Die ersten verfügbaren Antikörper gegen mitochondriale Proteine waren - infolge des starken Interesses an der Aufklärung der Energiekonservierung - gegen Untereinheiten der verschiedenen Membrankomplexe gerichtet. Ihr Einsatz führte unter anderem zu dem Befund, daß kernkodierte Untereinheiten in der Regel als höhermolekulare Vorstufen synthetisiert und erst beim Ein -

schleusen in die Organellen zur reifen Form prozessiert werden (Maccacchini et al., 1979). Man erhoffte, aus Primärsequenzen, die von den DNA-Daten der isolierten Gene abzuleiten sind, Aufschlüsse über die Eigenschaften der abgespaltenen Präsequenzen und darüber hinaus Einblicke in den mitochondrialen Proteinimport zu gewinnen.

Ein Modellsystem zu Studien der in den drei Punkten angesprochenen Art ist die Ubichinol-Cytochrom c Reduktase (Komplex III). Nur eine Untereinheit (Cytochrom b) ist mitochondrial kodiert, die restlichen werden von Kerngenen spezifiziert und im Cytoplasma als Präkursormoleküle mit abspaltbarer Präsequenz synthetisiert. Die importierten Untereinheiten bestehen aus einem Eisen-Schwefel Protein (25 kD), Cytochrom c₁ und sieben weiteren Polypeptiden (44 kD, 40 kD, 17 kD, 14 kD, 11 kD, 5.5 kD, 3.5 kD) mit bisher noch unbekannter Funktion. Die Gene für fünf dieser Untereinheiten wurden inzwischen identifiziert (40,17, 14,11: D.vanLoon, 1984; 44: Suissa et al., 1984); im Fall von zwei Polypeptiden liegen bereits Sequenzdaten vor (D.vanLoon, 1984).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, das Strukturgen des Cytochroms c₁ der Hefe zu isolieren und zu charakterisieren. Mehrere Gründe führten zu dieser Aufgabenstellung:

1. Die Beteiligung des Cytochroms c₁ unmittelbar am Elektronentransport war bereits bekannt. In der Atmungskette überträgt Cytochrom c₁ Elektronen auf Cytochrom c.
2. Cytochrom c₁ unterliegt nicht nur der Glukoserepression wie viele andere mitochondriale Proteine, sondern wird darüber hinaus noch durch Sauerstoff und Häm reguliert.
3. Der Importweg des Cytochroms c₁ ist der bisher komplexeste aller bekannten Einschleusungsvorgänge. Er schließt zwei Prozessierungsschritte ein; dabei ist Häm notwendig und ein zumindest teilweiser Umweg des Proteins über die Matrix.
4. Es standen karyotische, atmungsdefekte Mutanten mit einem spezifischen Ausfall von Cytochrom c₁ zur Verfügung. Der Phänotyp einer Gruppe dieser Mutanten ließ den Schluß zu, daß der Defekt im Strukturgen des Cytochroms c₁ lag.

Die Isolierung des Gens erfolgte über genetische Komplementation nach Transformation der geeigneten Mutantenstämme mit einer Hefe-Genbank im Plasmid YEp13.

Die Sequenzierung wurde nach der Dideoxymethode von Sanger

durchgeführt (Sanger et al., 1977, 1980). Insgesamt ist jetzt eine kontinuierliche Sequenz von ca. 1900 bp bekannt.

Präkursorprotein

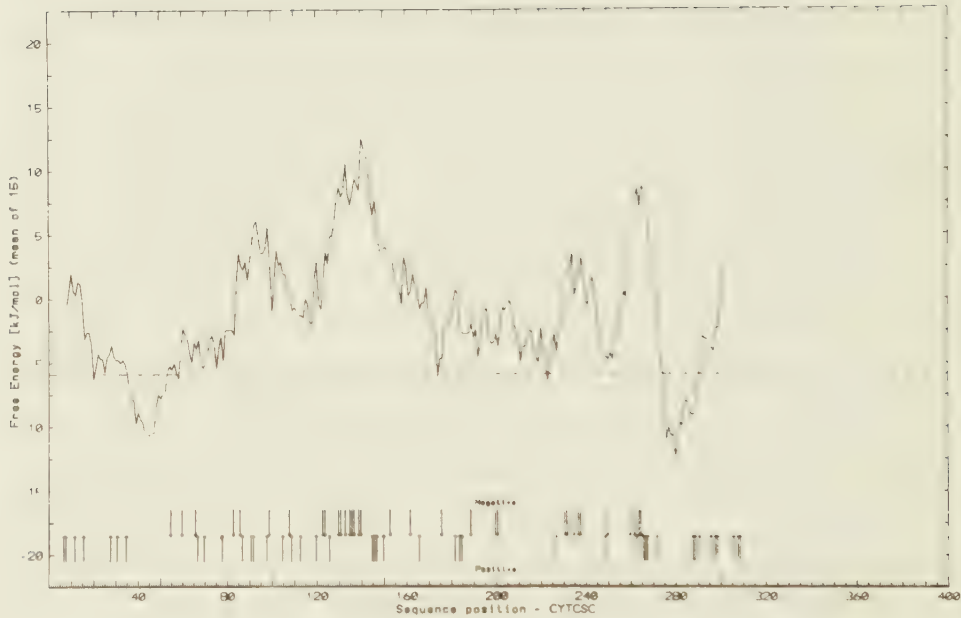
Die kodierende Region besteht aus 927 Nukleotiden; dies entspricht einem Protein von 309 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 34016. Damit ist das Präkursorprotein um ca. 3000 kleiner als durch Molekulargewichtsbestimmung im SDS-Gel ermittelt wurde. Es ist aber inzwischen von vielen mitochondrialen Proteinen bekannt, daß ihr scheinbares Molekulargewicht in der SDS-Elektrophorese weit vom tatsächlichen Molekulargewicht abweichen kann.

Der Codongebrauch (54 von 61 möglichen Codons werden benutzt) deutet nach der von Bennetzen and Hall (1982) gefundenen Korrelation auf ein schwach exprimiertes Hefegen hin. Dies steht auch in Einklang mit der geringen Menge an translatierbarer Cytochrom c_1 -mRNA.

Die Verteilung der hydrophoben Gruppen wird im Lipophilizitäts-blot (Fig.25) sichtbar. Deutlich sieht man zwei stark hydrophobe Bereiche (unterhalb der gestrichelten Linie), einen in der Präsequenz, den anderen am C-Terminus des Proteins.

Typische Hefesignale zum Entfernen von Introns fehlen im kodierenden Bereich; ebenfalls deutet die große, durchgehende Homologie zu Rinderherz-Cytochrom c_1 und der Vergleich zwischen tatsächlichem und apparentem Molekulargewicht nicht auf das Vorliegen von Introns hin.

Im Vergleich zu Rinderherz-Cytochrom c_1 besitzt Hefe-Cytochrom c_1 drei zusätzliche Aminosäuren (Pro, Arg, Lys) am Carboxyterminus. Da bisher der Carboxyterminus des reifen Cytochroms c_1 noch nicht analysiert wurde, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, ob diese drei Aminosäuren das tatsächliche COOH-Ende bilden oder ob sie eine abspaltbare Signalsequenz spezifizieren, die während der Umwandlung des Präkursors zur reifen Form entfernt wird (eg. Suchanek and Kreil, 1977).



Figur 25 : Lipophilizitätsplot

Verteilung von geladenen und hydrophoben Aminosäuren im Cytochrom c_1 -Präkursor. Die Berechnungen erfolgten nach v.Heijne (1981); die positiven und negativen Aminosäuren wurden durch Pfeile dargestellt.

Reife Form

Die reife Form besteht aus 248 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 27 419 (scheinbares Molekulargewicht im SDS-Gel 31 000) und weist eine Homologie von 56,5% zu Rinderherz-Cytochrom c_1 auf.

Der Aminoterminus der im Komplex III integrierten, funktionalen Form des Hefe-Cytochroms c_1 wurde kürzlich durch Aminosäureanalyse des gereinigten Proteins bestimmt (pers. Mitteilung Dr.D.vanLoon). Er beginnt mit der Aminosäure Methionin an Position 62 des Präkursors. Ebenfalls mit Methionin beginnt die bisher bekannte, 10 Aminosäuren lange Sequenz des Aminoterminus von Neurospora crassa (50% Homologie zu Hefe) (Tsugita et al., 1979). Erst drei Aminosäuren weiter, bei Serin, liegt der Anfang des reifen Rinderherz-Cytochrom c_1 . Da das korrespondierende Gen bisher nicht isoliert worden ist, bleibt im Moment noch unklar, ob der Start bei Serin das tatsächliche aminoterminale Ende des Rinderherz-Cytochroms c_1 darstellt oder ob bei der Isolierung des stark proteolyseempfindlichen Polypeptids die ersten Aminosäuren abgespalten wurden.

Die Häm-bindende Sequenz Cys Ala Ala Cys His befindet sich am aminoterminalen Ende des Proteins (Position 40-44, bezogen auf reife Form) und ist mit den flankierenden Aminosäuren sehr stark homolog zu den äquivalenten Formen von Rinderherz und Paracoccus denitrificans (Ludwig et al., 1983). Neben den vier Pyrrol-Stickstoffen des Porphyrins als bekannte planare Liganden des Häm-Eisens sind die axialen Liganden noch unsicher. Wakabayashi et al., (1980) schlagen bei Rinderherz als 5. und 6. Liganden in Analogie zu Cytochrom c Histidin (Position 44) und Methionin (Position 208) vor. Meyer and Kamen (1982) bevorzugen in ihren theoretischen Überlegungen ein Met an Position 160 als 6. Liganden. Dieser Meinung kann eher zugestimmt werden, da in der Sequenz des Hefe-Cytochroms c_1 das zu Met 160 (Rinderherz) homologe Methionin an der zu erwartenden Stelle auftritt, nicht hingegen das Methionin an der Stelle 208. Von Position 185 bis zum COOH-Ende tauchen in der Hefesequenz keine Methionins mehr auf. Tervoort und v.Gelder (1983) bezweifeln die Rolle des Histidin 44 als 5. Ligand und schlagen vielmehr ein Cystein (mit bisher unbekannter Position) dafür vor. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß das Hefe-Cytochrom c_1 neben dem Paar, das für die kovalente Hämbindung benötigt wird, noch zwei weitere

Cysteine (Position 127 und 197, bezogen auf reife Form) besitzt. Im Moment bleiben aber alle Ligandenbestimmungen noch spekulativ, eine zweifelsfreie Zuordnung kann nur durch Röntgenstruktur - analyse erhalten werden.

Erst kürzlich ist mit chemischen Methoden die wahrscheinliche Bindungsstelle auf dem Cytochrom c_1 von Rinderherz zu Cytochrom c bestimmt worden (Stonehuerner et al., 1985). Cyto - chrom c fungiert als mobiler Träger im Elektronentransport zwischen dem Komplex III und der Cytochrom c Oxidase. Sieben bis acht seiner hoch konservierten Lysinreste, welche die Hämtasche des Cytochroms c in nächster Nähe "umzingeln", werden als wichtig für die Interaktion mit dem Komplex III angesehen. Ein Ring von negativ geladenen Carboxylatgruppen um das Häm des Cytochroms c_1 wurden in Analogie zu den ebenfalls Cytochrom c bindenden Häm - Proteinen Cytochrom c Peroxidase und Cytochrom b_5 als Bindungsstelle postuliert. Als wahrscheinlicher Ort wird die stark saure Region zwischen Position 63 und 81 angesehen, wobei den Aminosäuren an Position 66 (Glu), 67 (Glu), 76 (Glu) und 77 (Asp) besondere Bedeutung zukommen soll. Während die zwei ersten Positionen im homologen Hefeprotein identisch sind (Positionen 69 und 70), sind die Asparaginsäure und die Glutaminsäure vertauscht (Positionen 78 und 79). Da im Bereich der präsumptiven Bindungs - stelle noch weitere saure Gruppen vorkommen, dürfte auch hier erst nach Röntgenstrukturanalyse eines Cytochrom c-bindenden Komplexes III der detaillierte molekulare Mechanismus der Cyto - chrom c-Bindung zu entschlüsseln sein. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist, daß möglicherweise ein zweites Polypeptid des Komplexes III das sogenannte "hinge protein" (King, 1983) an der Bindung beteiligt ist.

Nahe dem C-terminus (Position 212-227) befindet sich eine Sequenz von 15 ungeladenen Aminosäuren, die von geladenen Aminosäuren flankiert wird. Eine ebenso lange hydrophobe Sequenz, allerdings mit kaum ausgeprägter Homologie zu Hefe, findet man an der iden - tischen Position beim Rinderherz-Cytochrom c_1 . Die Struktur ähnelt einem transmembranen Segment und es dürfte als wahr - scheinlich gelten, daß sie das reife Cytochrom c_1 in der mitochondrialen Innenmembran verankert. Entfernt man nämlich diese Sequenz, ist das Cytochrom c_1 in diesem Kompartiment nicht mehr nachweisbar (Dr.D.vanLoon, pers.Mitteilung). Von Cytochrom f im Cytochrom b-Cytochrom f Komplex der Chloro -

plasten nimmt man an, daß es eine dem Cytochrom c_1 entsprechende Rolle im Elektronentransport spielt (Hauska et al., 1983). In der Tat scheinen einige strukturelle Merkmale ähnlich zu sein. So ist Cytochrom f (285 Aminosäuren) etwa so groß wie Cytochrom c_1 (248 Aminosäuren), darüber hinaus finden sich Homologien im Bereich der Häm-Bindungsstelle (bei Cytochrom f auch im aminoterminalen Bereich) und der ebenfalls C-terminalen Ankersequenz. Die restlichen Sequenzen, die keine Homologie zeigen, bilden vermutlich unterschiedliche Strukturen aus, um mit den in Chloroplasten und Mitochondrien unterschiedlichen Redoxkomponenten in Wechselwirkung treten zu können. Die topologische Orientierung beider Proteine in der Membran ist aber identisch. Beide ragen mit der Hauptmasse des Proteins (inklusive Häm-Bindungsstelle) in einen Zwischenmembranraum (Wiley et al., 1984).

Die Präsequenz

Die Präsequenz besteht aus den 61 aminoterminalen Aminosäuren des Präkursorproteins und wird während des Imports sequentiell in zwei proteolytischen Schritten entfernt (Ohashi et al., 1982). Ihr Molekulargewicht beträgt 6597. Bemerkenswert sind zwei hydrophobe Bereiche, die jeweils von geladenen Aminosäuren flankiert werden. Die erste Region umfaßt 11 Aminosäuren (Position 17-27), die Begrenzung erfolgt durch jeweils ein Lysin; die zweite Sequenz ist 19 Aminosäuren (Position 36-54) lang und wird von einem Lysin (N-terminal) und einer negativen Asparaginsäure (C-terminal) flankiert. Der erste Teil der Präsequenz (Position 1-35) ist vorwiegend positiv geladen (7 Lysin bzw. Arginin), dann folgt der längere hydrophobe Teil (Position 36-54). Den Abschluß bildet eine kurze, negativ geladene Sequenz mit einer Asparaginsäure und einer Glutaminsäure.

Folgende Funktionen einer Präsequenz werden gegenwärtig diskutiert:

Sie könnte a) ein hydrophobes Membranprotein im Cytoplasma löslich machen (z.B. Viebrock et al., 1982)

b) eine beim Import benötigte dreidimensionale Faltung des Präkursorproteins stabilisieren

und zusätzlich c) die Informationen enthalten, die das Protein zum Mitochondrium dirigieren und es dort zur richtigen Stelle im

korrekten Kompartiment bringen.

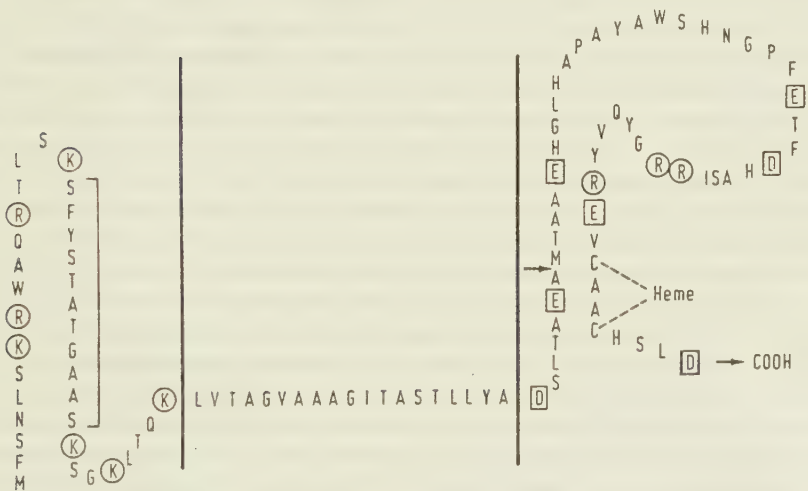
In den letzten Jahren wurden die Präsequenzen sehr vieler kernkodierter Proteine, die in Mitochondrien oder Chloroplasten transportiert werden, bei verschiedenen Eukaryonten (Hefe, *Neurospora crassa*, Säugetieren) bestimmt. Sequenzhomologien zwischen den diversen Präsequenzen konnten nicht gefunden werden; gemeinsam ist ihnen aber ein hoher Gehalt an Serin, Threonin und an positiv geladenen Aminosäuren (Lysin und Arginin). Letztere sind in der Regel immer im Überschuß, sehr viele Präsequenzen besitzen gar keine negativen Ladungen mehr. Zur Erfüllung der erwähnten Aufgaben scheint also nicht eine generelle Consensus-Sequenz, sondern hauptsächlich die dreidimensionale Struktur des Präkursorproteins und ein bestimmtes Ladungsverhältnis in der Präsequenz ausschlaggebend zu sein.

Das Charakteristikum der zweistufigen Prozessierung haben neben Cytochrom c_1 noch einige andere Proteine, z.B. Cytochrom b_2 (IMS) (Däum et al., 1982), CCPO (IMS) (Maccacchini et al., 1979), Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (Stroma) (Robinson and Ellis, 1979).

Für die drei mitochondrialen Proteine (Cytochrom c_1 , CCPO, Cytochrom b_2) ist bekannt, daß der erste Prozessierungs - schnitt von einer Matrixprotease durchgeführt wird und eine intermediäre Form liefert; der zweite Schnitt, der die reife Form freisetzt, wird von einer zweiten Protease (Gasser et al., 1982) durchgeführt. Bisher unbekannt ist, ob diese Protease für alle Proteine identisch ist, oder ob jedes Protein seine eigene benötigt.

Die Struktur der Präsequenzen dieser drei mitochondrialen Proteine ist bekannt und relativ ähnlich: wie schon für Cytochrom c_1 beschrieben, treten überwiegend positiv geladenen Aminosäuren auf, nur am C-Terminus findet man, mit Ausnahme von CCPO, auch negativ geladene. Die Präsequenzen enthalten eine lange hydrophobe Region (CCPO 33, Cytochrom b_2 21 und Cytochrom c_1 19 Aminosäuren), die absolut nötig für die Einschleusung ins korrekte Kompartiment ist. Zur Abspaltung des ersten Teils der Präsequenz führt der Weg der Proteine (zumindest teilweise) zuerst in die Matrix. Die hydrophobe Sequenz durchspannt von der Länge her die mitochondriale Innenmembran, wenn man annimmt, daß sie als Helix vorliegt (Tanford, 1978). Eine Analyse nach Chou und Faßmann (1978) zur Bestimmung der Sekundärstruktur ergibt für

diesen Teil bei Cytochrom c_1 und CCPO tatsächlich eine helikale Struktur. Sie könnte deshalb als Stop-Transfer Sequenz dienen, d.h. als eine Sequenz, deren hydrophober Teil die Membran durchspannt, während die geladenen Flanken verhindern, daß das Protein vollständig in den Matrixraum "durchrutscht". Bezogen auf Cytochrom c_1 ergibt sich dann folgendes Bild:



Figur 26 : Mögliche Orientierung des Cytochrom c_1 -Präkursors in der inneren Mitochondrienmembran.

Basische und saure Aminosäuren sind durch Kreise bzw. Rechtecke gekennzeichnet. Die zwei vertikalen Linien geben die innere Mitochondrienmembran wieder, der Pfeil zeigt die zweite Schnittstelle und die Klammer die wahrscheinliche Region der ersten Schnittstelle.

Die 35 N-terminalen Aminosäuren befinden sich in der Matrix, die Aminosäuren 36-54 in der inneren Membran und der Rest (55-309) im IMS. Die Matrixprotease setzt ihren Schnitt an den 35 N-terminalen Aminosäuren; die Schnittstelle ist unbekannt, liegt aber wahrscheinlich in der mit einer Klammer bezeichneten Region, da der Schnitt das Molekulargewicht um ca. 2000 (Ohashi et al., 1982) reduziert. Das sich ergebende, in der Membran verankerte Intermediat bindet dann ein Molekül Protohäm IX über Thioäther-Brücken zu den Cysteinen 101 und 104. Dadurch könnte sich eine neue Konformation ausbilden, die den zweiten proteolytischen Schnitt zwischen Ala₆₁ und Met₆₂ ermöglicht. Diese Konformationsänderung muß nicht notwendigerweise durch die Hämbindung induziert werden (wie wahrscheinlich bei Cytochrom c₁); sondern könnte auch allein durch das Entfernen des ersten Teils der Präsequenz ausgelöst werden, denn bei Cytochrom b₂ und CCPO z.B. ist eine Hämbindung nicht nötig. Der zweite Schnitt setzt den Aminoterminus des Cytochroms c₁ frei, so daß er dann in den Intermembranraum ragt. Festgehalten in der Membran wird das Protein von der hydrophoben Sequenz am C-Terminus (siehe Diskussion der reifen Form). Daß Cytochrom c₁ ohne diese Stop-Transfer-Sequenz tatsächlich ganz in den Matrixraum geht, konnten Versuche von D.van Loon zeigen (vanLoon et al., in press). In Genfusionsexperimenten, in denen die Autoren die Funktion der verschiedenen Teile der Präsequenz analysiert haben, wurde diese mit dem Gen des Matrixproteins DHFR (Dihydrofolat-Reduktase) der Maus verbunden. Konstrukte, welche die ganze intakte Präsequenz enthalten, führen zur Akkumulation von DHFR im IMS. Entfernt man die 19 hydrophoben Aminosäuren der membrandurchspannenden Sequenz taucht das Hybridprotein in der Matrix auf. Diese Befunde legen nahe, daß der erste Teil der Cytochrom c₁-Präsequenz die Information enthält, die das Präkursorprotein an die Mitochondrien binden läßt und zum Import in die Organelle benötigt wird und der zweite Teil (mit der "Stop-Transfer-Sequenz") das Protein an dem ihm bestimmten Ort lokalisiert. Vergleicht man die Präsequenz von Matrixproteinen (Citratsynthase (Suissa et al., 1984), OTC = Ornithin-Transcarbamylase (Takiguchi et al., 1984), SOD (Marres et al., 1985), EFTu = Elongationsfaktor Tu (Nagata et al., 1983)) mit den zuvor beschriebenen Proteinen, die zweistufig eingeschleust

werden, zeigt sich, daß erstere keine lange hydrophobe Sequenz besitzen, sondern daß geladene Aminosäuren (in der Hauptsache auch hier positive) gleichmäßig über die Präsequenz verteilt sind. Das gleiche gilt auch für die bis jetzt sequenzierten Gene der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase. Während, wie bereits erwähnt, Cytochrom c_1 nur mit einer kurzen Sequenz in der inneren Membran verankert ist und der übrige Teil in den IMS ragt, handelt es sich bei den Cytochrom c Oxidase Untereinheiten um transmembrane Proteine, deren Hauptteil vermutlich zum Matrixraum hin orientiert ist. Deshalb gehen sie vielleicht zunächst ganz in den Matrixraum und werden dann von innen in die Membran integriert.

Es wird deshalb vermutet, daß Präsequenzen ohne "Stop-Transfer"-Region die anhängenden reifen Formen in die Matrix durchlassen, während im anderen Fall das Protein in der Membran festgehalten wird.

Fusionsexperimente von E.C.Hurt et al. unterstützen diese Ansicht: Die ersten 12 Aminosäuren eines Proteins der äußeren Mitochondrienmembran wurden an ein Präsequenz-looses COX IV (Cytochrom c Oxidase, Untereinheit IV) -Gen bzw. an DHFR gekoppelt (Hurt et al., 1985).

Proteine der äußeren Mitochondrienmembran (z.B. Porin, 70 kDa-Protein) haben keine abspaltbare Präsequenz; die Information zur Bindung an die Mitochondrien bzw. zur Lokalisierung in der äußeren Membran muß im reifen Protein enthalten sein. Aus Deletionsversuchen beim 70 kDa-Protein wurde geschlossen, daß die ersten 12 Aminosäuren (hydrophil und basisch) für das Erkennen der Mitochondrien nötig sind und daß der folgende hydrophobe Bereich (27 Aminosäuren) das Protein in der äußeren Membran verankert (Hase et al., 1984). Fehlt diese hydrophobe Sequenz, findet man das 70 kDa-Protein in der Matrix.

Die oben beschriebenen Fusionsproteine (die 12 ersten Aminosäuren des 70 kDa-Proteins an das reife COX IV-Gen bzw. an das DHFR-Gen gekoppelt) findet man tatsächlich in der Matrix; d.h. die 27 hydrophoben Aminosäuren dienen als "Stop-Transfer-Region".

Importierte Mitochondrienproteine der Matrix, der inneren Membran und des IMS benötigen zum Transport eine energetisierte innere Membran. Neuere Versuche zeigen, daß erstens nicht der ganze elektrochemische Protonengradient ($\Delta p = \Delta \psi + z \times \Delta pH$) benötigt wird, sondern nur das Membranpotential ($\Delta \psi$) selbst und zweitens,

daß diese Energie wahrscheinlich nur für den Import der Präsequenz benötigt wird, während der Rest des Proteins ohne Energie importiert werden kann (Pfanner and Neupert, 1985).

Wie die Energie beim Import eingesetzt wird, kann noch nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Eine Möglichkeit wäre, daß das Membranpotential auf positiv geladene Aminosäuren der Präsequenzen einwirkt. Dagegen spricht aber, daß die Membranpotentiale bei verschiedenen Membranen in unterschiedlichen Richtungen orientiert sein können (z.B. Bakterienmembranen entgegengesetzt zu Mitochondrienmembranen). Das Potential könnte aber auch eine Destabilisierung der Membran bewirken, so daß die hydrophilen Teile des Präkursors die Membran durchqueren können oder eine Konformationsänderung der an einen Rezeptor gebundenen Präkursormoleküle auslösen, woraufhin sie dann transloziert werden können. Letztendlich könnte es außerdem an der Bildung oder Beibehaltung der Kontaktstellen der zwei mitochondrialen Membranen beteiligt sein, durch die der Import der Moleküle erfolgen soll (Schleyer and Neupert, 1985).

Als Gemeinsamkeit der Präkursorproteine fällt bisher auf (v.Heijne, 1983), daß die letzte Aminosäure vor der Schnittstelle klein und ungeladen ist (Ala, Gly, Ser, Cys, Thr, Glu) und unmittelbar nach der Schnittstelle oder kurz darauf häufig eine geladene (positiv oder negativ) Aminosäure kommt. Die Matrixprotease schneidet also ganz verschiedene Peptidbindungen; sie scheint nicht eine Aminosäuresequenz zu erkennen, sondern nur eine bestimmte dreidimensionale Struktur. Deshalb kann man derzeit bei Präkursorproteinen, deren Präsequenz zweimal geschnitten wird (wie Cytochrom c), nicht vorhersagen an welcher Stelle der von der Matrixprotease gesetzte erste Schnitt erfolgt. Eine genauere Bestimmung des N-Terminus der intermediären Form scheint nur durch deren Isolierung und Aminosäuresequenzierung möglich zu sein.

Nicht-kodierende 3'-Region

276 bp der nicht-kodierenden 3' Region wurden im Verlauf der Arbeit sequenziert und auf Signalsequenzen der Transkriptionstermination und der Polyadenylierung geprüft. Während in Säugerzellen diese beiden Prozesse vermutlich nicht gekoppelt sind, scheinen bei Hefe die Polymerase II-Termination und die polyA-Addition verknüpft zu sein (Zaret and Sherman, 1982). Alle bisher

untersuchten Transkripte, selbst aberrante, trugen nämlich immer einen polyA-Schwanz.

In der Literatur werden verschiedene 3'-seitige Sequenzen mit positivem Einfluß auf die genannten zwei Funktionen diskutiert.

1. Zaret und Sherman (1982) postulieren als Kontrollregion für beide Prozesse die Sequenz: Stopkodon / 1-140 bp AT-reich / TAG.....TAGT oder TATGT / 10-17 bp AT-reich / TTT. Eine teilweise ähnliche Sequenz findet sich auch bei Cytochrom c₁: Stopkodon / 95 bp AT-reich / TAGT / 16 bp AT-reich / TTT.

Eine Northern-Blot-Analyse erlaubte den Schluß auf eine Cytochrom c₁-Transkriptlänge von ca. 1200 b. Mit Hilfe dieses Wertes und des durch S1 Kartierung bestimmten Transkriptionsstarts (-170, bezogen auf das Startkodon ATG), kann der Transkriptionsstop auf ca. 100 bp nach dem Stopkodon TAG festgelegt werden; d.h. er liegt in dem Bereich, den Zaret und Sherman für das Iso-1-Cytochrom c-Gen vorgeschlagen haben.

2. Henikoff et al. (1983) ordnen der Sequenz TTTTATA als Teil der Terminations-Kontrollregion besondere Bedeutung zu. Diese Sequenz konnte aber bisher nur bei einem Teil der untersuchten Hefegene identifiziert werden (z.B. CYC 1-Gen).

Beim Cytochrom c₁ findet sich in der Kontrollregion die um ein bp verkürzte Sequenz TTTTAT an der Position 1092 (gemessen vom Translationsstart).

3. Bei der Polyadenylierung von Transkripten höherer Eukaryonten soll die Sequenz AATAAA eine wichtige Rolle spielen (Fitzgerald and Shenk, 1981); dort befindet sie sich 10-30 bp upstream der polyA-Additionsstelle. Ihre Funktion in Hefegenen ist bisher nicht untersucht. Im Cytochrom c₁-Gen finden sich an der zu höheren Eukaryonten äquivalenten Stelle (vor der Transkriptionstermination) an den Positionen 983 und 999 zwei derartige hexamere Sequenzen.

4. Die Sequenz CAYTG kommt häufig in der Umgebung der Polyadenylierungsstelle vor (Berget, 1984). Eine gezielte Analyse ihrer Funktion ist aber bisher noch nicht erfolgt. Beim Cytochrom c₁ findet man eine solche Sequenz (CACTG) bei Position 1046; sie liegt aber 3'-seitig vom Terminationsbereich, so daß fraglich ist, ob sie etwas mit den beiden diskutierten Prozessen zu tun hat.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß derzeit noch zu wenig Daten bei Hefe vorliegen, um mit Sicherheit generelle Aussagen über

cis-wirksame 3'-Sequenzen von Genen zu treffen. Dazu würden nur in verstärktem Maße durchgeführte Deletionsanalysen mit S1-Kartierung verhelfen. Diese sind aber methodisch am 3'-Ende eines Gens schwer handzuhaben.

Nicht-kodierende 5'-Region

Ca. 600 bp 5'-seitig vom Translationsstart wurden sequenziert; die Sequenz wurde aus zwei sich überlappenden, Cytochrom c₁-Fragmenten (41/1 und 113a) erhalten. Im nicht-kodierenden 5'-Bereich von Hefegenen gibt es mehrere Signalsequenzen, denen eine Funktion bei der Regulation der Genexpression zugeordnet wird. Wie bei mehreren anderen Hefegenen, findet man bei Cytochrom c₁ zwei TATA-Boxen (Position -211 und -251); das steht im Gegensatz zu den meisten Genen anderer Eukaryonten und Bakterien, die nur eine besitzen. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß der Transkriptionsstart nicht durch einen genau bestimmten Abstand zur TATA-Box festgelegt ist. Chen und Struhl (1985) haben mit Deletions- und Insertionsexperimenten gezeigt, daß die maximale, noch effektive Distanz zwischen TATA-Box und Initiationsstelle der Transkription ca. 100 bp beträgt, die minimale Distanz ca. 30 bp. Auch nach Bestimmung der Initiationsstelle mit S1-Kartierung läßt sich deshalb nicht entscheiden, welche der beiden TATA-Boxen die funktionelle ist. Dies ist nur durch Ausschalten der jeweiligen Box durch Deletion zu analysieren.

S1-Kartierung legte den Beginn der Transkription auf einen Bereich um -170 (bezogen auf das ATG Startcodon) fest. Auf dem entsprechenden Autoradiogramm war nur eine einzige Bande sichtbar, woraus man schließen kann, daß es bei Cytochrom c₁ nur einen definierten Transkriptionsstart gibt. Dieser Befund wurde durch eine Northern-Analyse erhärtet. Nach Hybridisierung eines Cytochrom c₁-Fragments gegen Gesamt-RNA konnte ebenfalls nur eine Bande identifiziert werden. Anders ist die Sachlage beim Iso-1-Cytochrom c-Gen, wo mehrere Initiationsstellen und Transkripte gefunden wurden (Faye et al., 1980; McNeil and Smith, 1986).

Eine postulierte Sequenz für die "Cap site" ist T/C CATTC G/A (Hentschel et al., 1980). Bei den untersuchten Genen liegt das 5'-Ende der mRNA innerhalb oder in der Nähe dieses Heptamers. In der 5'-Region des Cytochrom c₁-Gens wurde eine ähnliche

Sequenz (GCATTCA) bei der Position -148 gefunden. Sie liegt ca.20 bp entfernt vom Transkriptionsstart, so daß ihre Funktion fraglich ist.

Beim CYC 1-Gen wurden von Mason und Guarente "upstream activation sites" (UAS) entdeckt, die die Transkription nach dem Angebot an Kohlenstoffquellen und gemäß dem intrazellulären Häm Spiegel regeln (Guarente et al., 1983, 1984;). Die Autoren fanden zwei dieser teilweise zueinander homologen Sequenzen bei der Position -295 bzw. -345 (bezogen auf den Translationsstart). Ähnliche, dazu homologe Sequenzen wurden inzwischen auch bei anderen Proteinen gefunden (SOD: Marres et al., 1985; Cytochrom b_2 : Guiard, 1985; Katalase: Ruis, pers. Mitteilung); die Analyse der Funktion steht aber noch aus. Im folgenden sind die zu UAS1 von Iso-1-Cytochrom c homologen Sequenzen dargestellt; die übereinstimmenden Basen sind eingerahmt.

Potentielle UAS-Sequenzen verschiedener Gene im Vergleich zum CYC1-Gen

UAS1:	C	T	C	-	T	T	T	G	G	C	C	G	G	G	G	-	-	-	-	T	T	T	A	C		
UAS2:	C	T	C	A	T	T	T	G	G	C	G	A	G	C	C	-	-	-	-	T	T	G	G	T	G	G
Katalase:	C	T	C	-	T	T	T	T	C	A	A	G	G	G	G	-	-	-	-	A	T	-	C	A	C	
SOD:	C	T	C	-	-	T	T	G	G	C	G	T	C	T	A	T	C	C	T	A	T	T	T	G		
		T	C	A	-	T	T	G	T	T	G	G	C	G	C	G	A	C	C	-	T	T	A	A		
Cyt.b2:	T	T	C	-	T	T	-	G	G	C	-	G	G	-	-	-	-	-	-	T	T					
		T	T	A	-	T	T	-	G	G	T	C	G	G	G	-	-	-	-	T						
Cyt.c1:			C	-	T	T	T	A	C	C	C	T	G	C	G	-	-	-	-	T						
	T	T	T	-	T	T	T	C	T	C	-	G	G	A	-	-	-	-	-	T	T	T				

Da bekannt ist, daß auch die Expression des Cytochroms c_1 abhängig von Ham, Sauerstoff und Glukose ist, wurde vermutet, daß im 5'-nicht-kodierenden Bereich des Gens zu Iso-1-Cytochrom c homologe Sequenzen liegen.

In der Tat wurden zwei solcher Sequenzen mit ca. 60% Homologie bei den Positionen -440 und -530 gefunden (siehe Tabelle oben). Erste Vorversuche zur Bestimmung der funktionellen Bedeutung dieser Sequenzen erbrachten folgende Befunde: Fehlen die Bereiche 5'-seitig der Bam HI Stelle des Fragments 41/1, stellt man nach Transformation der entsprechenden Plasmide in eine Cytochrom c_1 -defekte Mutante fest, daß a) die Regulation durch Sauerstoff noch funktioniert. RNA aus anaerob gewachsenen Zellen ist nicht nachzuweisen, während bei aerob gewachsenen Zellen die Menge an gebildeter RNA der des Wildtyps entspricht. b) unter dereprimierten Bedingungen (als Kohlenstoffquelle Galaktose oder Laktat) genau soviel RNA wie bei Repression durch Glukose gebildet wird. Die Katabolitrepression funktioniert also nicht mehr (U.Oechsner, pers. Mitteilung). Der gleiche Befund ergibt sich auch auf Proteinebene (Dr.Haid, pers. Mitteilung). Diese Ergebnisse lassen den vorläufigen Schluß zu, daß cis-wirkende Sequenzen der Katabolitrepression in den Sequenzen 5'-seitig der Bam HI Stelle liegen. Ob sie mit einer oder beiden der oben erwähnten Sequenzen identisch sind, wird derzeit untersucht. Sauerstoffkontrolle und die eventuell damit verknüpfte Hämkontrolle (siehe Einleitung) scheinen durch Sequenzen vermittelt zu werden, die 3'-seitig der Bam HI Stelle liegen. In diesem Bereich sind aber keine Regionen mit ausgeprägter Homologie zu bisher bekannten UAS-Sequenzen zu identifizieren, d.h. im Fall von Cytochrom c_1 scheinen sie aus einer anderen, bisher unbekannten Basenabfolge zu bestehen. Überraschend ist außerdem, daß sie auch in kürzerer Entfernung zum Transkriptionsstart liegen würden, als das bei den bisher bekannten UAS-Sequenzen der Fall ist.

Expression des Cytochrom c_1 -Gens in verschiedenen Plasmidkonstruktionen

Episomale "multi copy"-Plasmide mit verschiedenen langen, das Cytochrom c_1 -Gen tragenden Fragmenten akkumulieren in Hefe unterschiedliche Mengen des Proteins. So ist in Transformanten

mit dem Plasmid YEp13-41 (Fragmentlänge 6 kb) im Vergleich zu jenen mit dem Plasmid YEp13-41/1 (Fragmentlänge 2.9 kb) die Menge an Cytochrom c_1 um das 5-10 fache höher. Ebenfalls eine hohe Überproduktion wurde beim Plasmid YEp24-112a (Fragmentlänge 4 kb) beobachtet.

Da beide überproduzierenden Plasmide am 3'-Ende Sequenzen enthalten, die dem "kurzen" YEp13-41/1 fehlen, wurde geprüft, ob diesen Sequenzen eine Bedeutung bei der Überexpression des Gens zukommt (z.B. durch Erhöhung der Transkriptionsrate).

Um für die zwei Klone YEp13-41 und YEp13-41/1 gleiche Voraussetzungen für eine Untersuchung zu schaffen, wurden das große (41) und das kleine (41/1) Fragment je in beiden Orientierungen in ein pCEN-Plasmid, das nur in einer Kopie pro Zelle vorliegt, umkloniert. Auf diese Art und Weise ließen sich der "multi copy"-Effekt des Vektors YEp13 sowie mögliche Wirkungen, die auf der Orientierung der Fragmente im Plasmid beruhen könnten, ausschalten. Mit den erhaltenen Plasmiden zeigte sich, daß nun nach Transformation beide Fragmente in gleicher Stärke Cytochrom c_1 exprimieren, d.h. die zusätzliche Sequenz des Fragments 41 trägt nicht zu einer Erhöhung der Genexpression bei. Weitere Analysen konnten zwar die unterschiedliche Anhäufung des Cytochroms c_1 mit der Kopienzahl des jeweiligen Plasmids korrelieren. Nicht klären ließ sich allerdings die Frage, weshalb die längeren Fragmente in YEp-Vektoren zu wesentlich erhöhten Kopienzahlen führen.

Festzuhalten bleibt, daß Überproduktionsphänomene in Transformatanten mit "multi copy number"-Plasmiden keinen Schluß auf das Maß und die Art der Regulation des klonierten Gens zulassen. Um die Wirksamkeit von regulatorischen Sequenzen quantitativ und unter "quasi" Wildtyp-Bedingungen zu testen, müssen diese in einer Kopienzahl, die der des Wildtyps entspricht, vorliegen. Dies geschah - wie gezeigt - in der Kombination Centromerplasmid - Cytochrom c_1 -Mutante ohne immunologisch nachweisbares Cytochrom c_1 . Obwohl dieser Versuchsansatz viele störende Parameter eliminiert, ist er nicht frei von Fehlerquellen. Das ideale System wäre die Rückführung eines isolierten Gens (mit und ohne Veränderung der Regulationssequenzen) in die korrekte chromosomale Umgebung. Damit wäre gewährleistet, daß die - möglicherweise für die Regulation wichtige - Chromatinstruktur

erhalten bleibt. Derartige Versuche werden derzeit in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Kurzer Ausblick

Mit dem isolierten Cytochrom c_1 -Plasmid sind nun einige weiterführende Untersuchungen auf den zum Teil schon in der Einleitung erwähnten Gebieten der Regulation, des Imports, der Assemblierung in den Komplex und des Elektronentransports möglich geworden.

Ein erster Schritt wäre die Herstellung einer Cytochrom c_1 -losen Mutante, entweder durch Integration eines Markergens (z.B. LEU2 oder URA3) in den proteinkodierenden Teil des Cytochrom c_1 -Gens oder durch gezielte Deletion des Promoterbereichs. Solche Mutanten würden gewährleisten, daß keine korrekten Cytochrom c_1 -Transkripte mehr von der Hefezelle selbst gebildet werden. Die Information zur Bildung von Cytochrom c_1 wird dann nur von eingeschleusten Plasmiden abgelesen. Durch gezielte Veränderung an Cytochrom c_1 -Plasmiden und deren Transformation in Cytochrom c_1 -lose Stämme könnten dann Ergebnisse zur Transkriptionsregulation des Gens (z.B. durch gezielte Veränderungen im Promoterbereich, in vitro Mutation der UAS-Sequenzen) oder zum Import des Proteins (z.B. durch Veränderung einzelner Aminosäurekodons in der Präsequenz) erhalten werden.

Literatur

- Bennetzen, J.L. and Hall, B.D. (1982) J.Biol.Chem., 257, 3026-3031
- Berget, S.M. (1984) Nature 309, 179-182
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523
- Blobel, G. (1980) PNAS USA 77, 1496-1500
- Boehni, P.; Gasser, S.; Leaver, C. and Schatz, G. (1980) in The Organization and Expression of the mitochondrial Genome (Kroon, A.M. and Saccone, C. eds.) Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 423-433
- Bolivar, F. and Backman, K. (1979) Methods Enzymol. 68, 245-267
- Bonitz, S.G.; Homison, G.; Thalenfeld, B.E. and Tzagoloff, A. (1982) J.Biol.Chem., 257, 6268-6274
- Botstein, D.; Falco, S.C.; Stewart, S.; Brennan, M.; Scherer, S.; Stinchcomb, D.T.; Struhl, K. and Davis, R. (1979) Gene 8, 17-24
- Botstein, D. and Davis, R.W. (1982) in Strathern, J.N.; Jones, E.W. and Broach, J.R. (eds.) The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY, 607-636
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) J.Mol.Biol. 41, 459-472
- Broach, J.R.; Strathern, J.N. and Hicks, J.B. (1979) Gene 8, 121-133
- Carle, G.F. and Olson, M.V. (1984) Nucleic Acids Res., 12, 5647-5664
- Carle, G.F. and Olson, M.V. (1985) PNAS USA, vol.82, 3756-3760
- Chamberlain, J.P. (1979) Anal.Biochem. 98, 132-135
- Chen, W. and Struhl, K. (1985) EMBO J. 4, 3273-3280
- Chevallier, M.-R.; Bloch, J.C. and Lacroute, F. (1980) Gene 11, 11-19
- Chirgwin, J.M.; Przybyla, A.E.; Mac Donald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) Biochemistry 18, 5294-5299
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978) Adv. in Enzymol. 47, 45-148
- Criddle, R.S. and Schatz, G. (1969) Biochemistry 8, 322-334
- Daum, G.; Boehni, P. and Schatz, G. (1982) J.Biol.Chem. 257, 13028-13033
- Dickerson, R.E. and Timkovich, R. (1975) in Boyer, P.D.(ed) The Enzymes, vol.11, Academic Press, NY London, 397-547

- Ebner, E.; Mason, T.L. and Schatz, G. (1973) J.Biol.Chem. 248, 5369-5378
- Falco, C.S.; Yuyang, L.; Broach, J.R. and Botstein, D. (1982a) Cell 29, 573-584
- Falco, S.C.; Li, Y.; Broach, J.R. and Botstein, D. (1982b) Cell 29, 573-584
- Falco, S.C. and Botstein, D. (1983) Genetics 105, 587-872
- Fasiolo, F.; Bonnet, J. and Lacroute, F. (1981) J.Biol.Chem. 256, 2324-2328
- Faye, G.; Leung, D.W.; Tatchell, K.; Hall, B.D. and Smith, M. (1981) PNAS USA 78, 2258-2262
- Fitzgerald, M. and Shenk, T (1981) Cell 24, 251-260
- Freitag, H.; Janes, M. and Neupert, W. (1982) Eur.J.Biochem. 126, 197-202
- Garoff, H. and Ansorge, W. (1981) Anal.Biochem. 115, 450-457
- Gasser, S.M.; Daum, G. and Schatz, G. (1982a) J.Biol.Chem. 257, 13034-13041
- Gasser, S.M.; Ohashi, A.; Daum, G.; Boehni, P.C.; Gibson, J.; Reid, G.A.; Yonetani, T. and Schatz, G. (1982b) PNAS USA 79, 267-271
- Gasser, S.M. and Schatz, G. (1983) J.Biol.Chem. 258, 3427-3430
- Giniger, E.; Varnum, S.M. and Ptashne, M. (1985) Cell 40, 767-774
- Guarente, L. (1984) Cell 36, 799-800
- Guarente, L. and Mason, T. (1983) Cell 32, 1279-1286
- Guarente, L.; Lalonde, B.; Gifford, P. and Alani, E. (1984) Cell 36, 503-511
- Guarente, L. and Hoar, E. (1984) PNAS USA 81, 7860-7864
- Gudenus, R.; Spence, A.; Hartig, A.; Smith, M. and Ruis, H. (1984) Curr. Gen. 8, 45-48
- Guiard, B. (1985) EMBO J. vol.4, 3265-3272
- Haid, A. and Suissa, M. (1983) Methods Enzymol. 96, 192-205
- Harney, M.A. and Neupert, W. (1985) in The Enzymes of Biological Membranes vol.4, Martonosi, A. (ed.) Plenum Publ., NY, 431-464
- Hase, T.; Riezman, H.; Suda, K. and Schatz, G. (1983) EMBO J. vol.2, 2169-2172

- Hase, T.; Müller, U.; Riezman, H. and Schatz, G. (1984) EMBO J. vol.3, 3157-3164
- Hauska, G.; Hurt, E., Gabellini, H. and Lockau, W. (1983) Biochimica et Biophysica Acta 726, 97-133
- Hay, R.; Boehni, P. and Gasser, S. (1984) Biochimica et Biophysica Acta 779, 65-87
- v.Heijne, G. (1983) Eur.J.Biochem. 133, 17-21
- v.Heijne, G. (1981) Eur.J.Biochem. 120, 275-278
- Henikoff, S.; Kelly, J.D. and Cohen, E.H. (1983) Cell 33, 607-614
- Hentschel, C.; Irminger, J.-C.; Bucher, P. and Birnstiel, M.L. (1980) Nature 285, 147-151
- Hinnen, A.; Hicks, J.B. and Fink, G.R. (1978) PNAS USA 75, 1929-1933
- Hope, I.A. and Struhl, K. (1985) Cell 43, 177-188
- Hurt, E.C.; Müller, U. and Schatz, G. (1985) EMBO J. vol.4, 3509-3518
- Jackson, R.Y. and Hunt, T. (1983) Methods Enzymol. 96, 50-73
- Johnson, D.A.; Gautsch, J.W.; Sportsman, J.R. and Elder, J.H. (1984) Gene Anal.Techn. 1, 3-8
- Kaput, J.; Goltz, S. and Blobel, G. (1982) J.Biol.Chem. 257, 15054-15058
- Katan, M.B.; Pool, L. and Groot, G.S.P. (1976) Eur.J.Biochem. 65, 95-105
- Kedes, L.H.; Chang, A.C.Y.; Houseman, D. and Cohen, S.N. (1975) Nature 255, 533-538
- Khoury, G. and Gruss, P. (1983) Cell 33, 313-314
- King, T.E. (1983) Adv. in Enzymol. 54, 267-366
- Korb, H. and Neupert, W. (1978) Eur.J.Biochem. 91, 609-620
- Labbe-Bois, R.; Urban-Grimal, D.; Volland, C.; Camadro, J.-M. and Dehoux, P. (1983) Mitochondria, (Kaudewitz, F.; Schweyen, R. and Wolf, K. eds.) de Gruyter, Berlin
- Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
- v.Loon, D. (1984) Ph.D.Thesis, University of Amsterdam
- v.Loon, A.P.G.M.; deGroot, R.J.; v.Eyk, E.; v.d.Horst, G.T.J. and Grivell, L.A. (1982) Gene 20, 323-337
- Lang, B.F. and Kaudewitz, F. (1982) Curr.Genet.6, 229-235

- Ludwig, B.; Suda, K. and Cerletti, N. (1983) Eur.J.Biochem. 137, 597-602
- Maccacchini, M.L.; Rudin, Y. and Schatz, G. (1978) J.Biol.Chem. 254, 7468-7471
- Maccacchini, M.-L.; Rudin, Y.; Blobel, G. and Schatz, G. (1979) PNAS USA 76, 343-347
- O'Malley, K.; Pratt, P.; Robertson, J.; Lilly, M. and Douglas, M.G. (1982) J.Biol.Chem. 257, 2097-2103
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) J.Mol.Biol. 53, 159-162
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) CSH Molecular Cloning, A Laboratory Manual
- Marres, C.A.M. (1983) Ph.D.Thesis, University of Amsterdam
- Marres, C.A.M.; v.Loon, A.P.G.M.; Oudshoorn, P.; V.Steeg, H.; Grivell, L.A. and Slater, E.C. (1985) Eur.J.Biochem. 147, 153-161
- Matner, R.R. and Sherman, F. (1982) J.Biol.Chem. 257, 9811-9821
- Mattoon, J.R.; Lancashire, W.E.; Sanders, H.K.; Carvajal, E.; Malamud, D.; Brag, G.R.C. and Panek, A.D. (1979) in Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen, W.J. Caughey, ed., New York, Academic Press, 421-435
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) Meth.in Enzymol. 65, 499-560
- McAda, P. and Douglas, M.G. (1982) J.Biol.Chem. 257, 3177-3182
- McKnight, G.L. and McConaughy, B.L. (1983) PNAS USA 80, 4412-4416
- McNeil, J.B. and Smith, M. (1986) J.Mol.Biol. 187, 363-378
- Messing, J. (1983) Methods Enzymol. 101, 20-78
- Meyer, T.E. and Kamen, M.D. (1982) Adv. in Protein Chemistry, vol.36, 109-212
- Mihara, K. and Sato, R. (1985) EMBO J. vol.4, 769-774
- Mihara, K.; Blobel, G. and Sato, R. (1982) PNAS USA 79, 7102-7106
- Montgomery, D.L.; Leung, D.W.; Smith, M.; Shalit, P.; Faye, G. and Hall, B.D. (1980) PNAS USA 77, 541-545
- Nagata, S.; Tsunetsugu-Yokota, Y.; Naito, A. and Kaziro, Y. (1983) PNAS USA 80, 6192-6196
- Neupert, W. and Schatz, G. (1981) TIBS 6, 1-4
- Oertel, W. and Mayer, M. (1984) MGG 195, 300-307
- Ohashi, A.; Gibson, J.; Gregor, I. and Schatz, G. (1982) J.Biol.Chem. 257, 13042-13047

- Pfanner, N. and Neupert, W. (1985) EMBO J. vol.4 2819-2825
- Pinkham, J.L. and Guarente, L. (1985) Mol. and Cell. Biol., 3410-3416
- Ricciardi, R.P.; Miller, J.S. and Roberts, B.E. (1979) PNAS USA 76, 4927-4931
- Richter, K.; Ammerer, G.; Hartler, E. and Ruis, H. (1980) J.Biol.Chem. 255, 8019-8022
- Riezman, H.; Hay, R.; Witte, C.; Nelson, N. and Schatz, G: (1983) EMBO J. vol.2, 1113-1118
- Robinson, C. and Ellis, J.R. (19) Eur.J.Biochem. 142, 343-346
- Ross, E. and Schatz, G. (1976) J.Biol.Chem. 251, 1997-2004
- Saltzgaber-Müller, J. and Schatz, G. (1978) J.Biol.Chem. 253, 305-310
- Saltzgaber-Müller, J.; Kunapuli, S.P. and Douglas, M.G. (1983) J.Biol.Chem. 258, 11465-11470
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) PNAS USA 74, 5463-5467
- Sanger, F.; Coulson, A.R.; Barrell, B.F.; Smith, A.Z.H. and Roe, B. (1980) J.Mol.Biol. 143, 161-178
- Schatz, G. and Mason, T.L. (1974) Ann.Rev.Biochem. 43, 51-87
- Schleyer, M.; Schmidt, B. and Neupert, W. (1982) Eur.J.Biochem. 125, 109-116
- Schleyer, M. and Neupert, W. (1985) Cell 43, 339-350
- Schwieters, M.T. (1981) Dissertation, Universität München
- Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F. (1970) Biochem.Biophys.Res.Comm. 38, 728-735
- Schweyen, R.J.; Steyrer, U.; Kaudewitz, F.; Dujon, B. and Slonimski, P.P. (1976) MGG 146, 117-132
- Sherman, F.; Steward, J.W.; Parker, J.H.; Inhaber, E.; Shipman, N.A.; Puttermann, G.J.; Gardinsky, R.L. and Margoliash, E. (1968) J.Biol.Chem. 107, 5446-5456
- x
- Siedow, J.N.; Power, S.; de la Rosa, F.F. and Palmer, G. (1978) J.Biol.Chem. 253, 2392-2399
- Sledziewski, A.; Rytka, J.; Bilinski, T.; Hörtnner, H. and Ruis, H. (1981) Curr.Genet. 4, 19-23
- Southern, E.M. (1975) J.Mol.Biol. 98, 503-517
- St.John and Davis, R.W. (1981) J.Mol.Biol. 152, 285-315

- Stonehuerner, J.; O'Brien, P.; Geren, L.; Millett, F.; Steidl, J.; Yu L. and Yu, C.-A. (1985) J.Biol.Chem. 260, 5392-5398
- Struhl, K.; Stinchcomb, D.T.; Scherer, S. and Davis, R.W. (1979) PNAS USA 76, 1035-1039
- Suchanek, G. and Kreil, G. (1977) PNAS USA 74, 975-978
- Suissa, M. and Schatz, G. (1982) J.Biol.Chem. 257, 13048-13055
- Suissa, M.; Suda, K. and Schatz, G. (1984) EMBO J. vol.3, 1773-1781
- Tagiguchi, M.; Miura, S.; Mori, M.; Masamiti, T.; Nagata, S. and Kaziro, Y. (1984) PNAS USA 81, 7412-7416
- Tanford, C. (1978) Science 200, 1012-1018
- Tervoort, M.J. and v.Gelder, B.F. (1983) Biochimica et Biophysica Acta, 722, 137-143
- Thomas, P.S. (1983) Methods Enzymol. 100, 255-266
- Tschumper, G. and Carbon, J. (1980) Gene 10, 157-166
- Tsugita A.; gregor, I.; Kubota, I. and v.d.Broek, R. (1979) in Cytochrome Oxidase, Elsevier/North Holland NY 67-77
- Tu, C.D. and Cohen, S.N. (1980) Gene 10, 177-183
- Tzagoloff, A. (ed.) (1975) Membrane Biogenesis, Plenum Press, New York
- Viebrock, A.; Perz, A. and Sebald, W. (1982) EMBO J. vol.1, 565-571
- Wakabayashi, S.; Matsubara, H.; Kim, C.H.; Kawai, K. and King, T.E. (1980) Biochem.Biophys.Res.Comm. 97, 1548-1554
- Wiley, D.L.; Auffret, A.D. and Gray, J.C. (1984) Cell 36, 555-562
- Winston, F.; Chumley, F. and Fink, G.F. (1983) Methods Enzymol. 101, 211-228
- Woloszczuk, K.W.; Sprinson, D.B. and Ruis, H. (1980) J.Biol.Chem. 255, 2624-2627
- Woodrow, G. and Schatz, G. (1979) J.Biol.Chem. 254, 6088-6093
- Yaffe, M.P. and Schatz, G. (1984) PNAS USA 81, 4819-4823
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. and Messing, J. (1985) Gene 33, 103-119
- Zaret, K.S. and Sherman, F. (1982) Cell 28, 563-573
- Zimmermann, R.; Paluch, U.; Sprinzl, M. and Neupert, W. (1979) Eur.J.Biochem. 99, 247-252

- Zitomer, R.S. and Hall, B.D. (1976) J.Biol.Chem. 251, 6320-6326
- Zitomer, R.S. and Nichols, D.L. (1978) J.Bacteriol. 135, 39-44
- Zitomer, R.S.; Montgomery, D.L.; Nichols, D.L. and Hall, B.D. (1979) PNAS USA 76, 3627-3631

X

- Shimomura, Y.; Nishikimi, M. and Ozawa, T. (1985) J.Biol.Chem. 260, 15075-15080

7. Zusammenfassung

Das Strukturgen des Cytochroms c_1 der Hefe Saccharomyces cerevisiae wurde durch Transformation einer Cytochrom c_1 -defekten Mutante mit einer genomischen Genbank nach genetischer Komplementation isoliert, sequenziert und charakterisiert:

1. Genetisch und biochemisch gut charakterisierte, atmungsdefekte Cytochrom c_1 -Mutanten wurden durch Umkreuzung für die Transformationsversuche verwendbar gemacht.

2. Nach Transformation der Mutanten mit einer Hefe-DNA-Genbank im Plasmid YEp13 wurden atmungskompetente Transformanten gefunden und daraus ein Plasmid mit einem 6 kb Fragment isoliert.

Expressionsversuche und Translation hybrid-selektierter RNA bewiesen, daß das 6 kb Fragment das Cytochrom c_1 -Gen kodiert.

3. Durch Subklonierung wurde ein 2.9 kb Fragment erhalten, das zusammen mit dem 6 kb-Fragment einer Restriktionsanalyse unterzogen wurde.

4. 1.6 kb des 2.9 kb-Fragments wurden sequenziert und ein offener Leserahmen identifiziert, der für das Cytochrom c_1 -Gen kodiert.

5. Neben der Sequenz des reifen Proteins konnte erstmals die Präsequenz von Cytochrom c_1 bestimmt werden.

6. Die Ausdehnung der Sequenzarbeiten 5'-seitig um ca. 300 bp führte zum Auffinden zweier potentieller UAS-Sequenzen, d.h. Sequenzen, die möglicherweise bei der Regulation der Transkription eine Rolle spielen.

7. Nach Untersuchungen des Cytochrom c_1 -Transkripts mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen und S1-Kartierung wurde ein ca. 1200 b. großes Transkript identifiziert, dessen Initiationsstelle 170 bp vor dem Translationsstart liegt.

8. Unterschiedlich lange Cytochrom c_1 -Fragmente wurden in das pCEN11-Plasmid integriert. Eine Analyse dieser Plasmide zeigte, daß Sequenzen 3'-seitig vom Gen keinen Einfluß auf die Genregulation besitzen.

9. Der Einsatz einer neuen Technik zur Auftrennung von ganzen Hefechromosomen erlaubte die Zuordnung des Cytochrom c_1 -Gens zum Chromosom VII.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank

- Herrn Prof.Dr.F.Kaudewitz für die Bereitstellung des Thomas und seine Unterstützung bei der Arbeit
- Herrn Dr.A.Haid für die Möglichkeit, in seiner Gruppe zu arbeiten, seine Betreuung und die anregenden Diskussionen
- den anderen Mitarbeitern der Gruppe Frau M.Redl und Frau R.Robel für ihre praktische Hilfe und den Diplomanden und Großpraktikanten Frau S.Garbrecht, C.Schindewolf, A.Wedel und H.Friedenreich für wertvolle Diskussionen, Hilfsbereitschaft und Interesse an meiner Arbeit. Sie alle haben dazu beigetragen, daß mir die Arbeit in der Gruppe immer Freude gemacht hat.
- Herrn Prof.Dr.G.Schatz, der mir einen Gastaufenthalt am Biozentrum Basel ermöglicht hat, und allen Mitgliedern seiner Gruppe, besonders Herrn K.Suda, Dr.G.Reid, Dr.T.Hase und Dr.M.Suissa, die mir bei der Sequenzierung wertvolle Hilfe geleistet und mir jedmögliche Unterstützung gewährt haben.
- Herrn Dr.B.Petri für die Einführung in die Arbeit mit dem Computer
- Frau T.Eisele für die Hilfe bei den Photographien
- Herrn U.Oechsner für die Hilfe bei der Northernanalyse
- Herrn D.Jäger und Frau E.-M. Geigl für die Bereitstellung von Filtern
- der DFG für die Finanzierung der Arbeit und EMBO und DAAD für das Stipendium in Basel
- und allen Mitarbeitern am Institut, die immer hilfsbereit waren und für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten

Lebenslauf

6.6.1956	geboren in Ilshofen, Baden-Württemberg
1963-1966	Volksschule Hessental
1966-1975	Gymnasium im Haal, Schwäbisch Hall
1975	Abitur
1975-1978	Studium der Biologie an der Universität Ulm
seit 1978	Studium der Biologie an der LMU München
1980-1981	Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie bei Prof.Dr.H.Schmieger
1981-1982	wiss.Angestellte am Institut für Physiologische Chemie
1983-1986	Doktorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie bei Prof.Dr.F.Kaudewitz

